UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1962 N° 24

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROTÉINES MYÉLOMATEUSES

Travail du Laboratoire de Chimie biologique (Professeur BOULANGER)
de la Faculté de Médecine de Lille
de la Clinique Médicale Nord (Professeur MERIEL)
et du Laboratoire de Chimie biologique (Professeur P. VALDIGUIÉ)
de la Faculté de Médecine de Toulouse.

●

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLÔME D'ÉTAT)

présentée et soutenue publiquement en Avril 1962

par

Pierre VALDIGUIÉ

Interne des Hôpitaux
Assistant de Biochimie
Licencié ès Sciences

MEMBRES DU JURY

MM.	MERIEL	*Président*
	DARDENNE	*Assesseurs*
	RUFFIE	—
	DOUSTE-BLAZY	—
	MONTASTRUC	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
9, Rue d'Astorg

1962

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DES

PROTÉINES MYÉLOMATEUSES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547605_0020

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1962 Nº 24

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROTÉINES MYÉLOMATEUSES

Travail du Laboratoire de Chimie biologique (Professeur BOULANGER)
de la Faculté de Médecine de Lille
de la Clinique Médicale Nord (Professeur MERIEL)
et du Laboratoire de Chimie biologique (Professeur P. VALDIGUIÉ)
de la Faculté de Médecine de Toulouse.

●

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLÔME D'ÉTAT)

présentée et soutenue publiquement en Avril 1962

par

Pierre VALDIGUIÉ

Interne des Hôpitaux
Assistant de Biochimie
Licencié ès Sciences

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MEMBRES DU JURY

MM.	MERIEL	*Président*
	DARDENNE	*Assesseurs*
	RUFFIE	—
	DOUSTE-BLAZY	—
	MONTASTRUC	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
9, Rue d'Astorg

1962

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN. . . . . M. LAZORTHES
1er ASSESSEUR . . . . . M. BLANC
2e ASSESSEUR . . . . . N...
Doyens Honoraires. . . . . MM. GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER
Professeurs honoraires. . . . MM. VALLOIS
Professeurs honoraires (suite) MM. DUCUING, CLERMONT, RIBAUT, NANTA, TAPIE, DELAS, RISER, SOULA

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique Médicale.	MM. MERIEL	Accouchement et obstétricie sociale.	MM. PONTONNIER
Clinique Médicale.	GADRAT	Anatomie.	LAZORTHES
Clinique chirurgicale et gynécologique.	FABRE (P.)	Anatomie appliquée.	POULHES
Clinique chirurgicale et du Cancer.	GRIMOUD	Anatomie pathologique. . . .	FABRE (J.)
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie.	VIRENQUE	Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale.	ANDRIEU
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques. . . .	BAZEX	Chimie biologique.	VALDIGUIE
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne.	MOREL	Electro-Radiologie.	MARQUES
Clinique des maladies des voies urinaires.	LHEZ	Embryologie générale	BROUSSY
Clinique médicale infantile et Puériculture.	SOREL	Histologie.	BIMES
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.	GERAUD	Hydrologie thérapeutique et climatologie.	DARNAUD
Clinique obstétricale.	GUILHEM	Médecine Légale et du Travail.	PLANQUES
Clinique odonto-stomatologique.	N...	Médecine Sociale.	BOUNHOURE
Clinique ophtalmologique. .	CALMETTES	Parasitologie.	BOUISSET
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale.	CALVET	Pathologie chirurgicale. . . .	DAMBRIN
Clinique traumatologique des membres.	RIEUNAU	Pathologie générale et Médecine expérimentale. . . .	SENDRAIL
Clinique rhumatologique . .	RUFFIE (R.)	Physico-Chimie.	AUVERGNAT
		Physiologie.	LAPORTE (Y.)
		Physiologie appliquée et Pharmacologie.	BAISSET
		Physique biologique et médicale.	BUGNARD
		Propédeutique médicale. . . .	GERAUD
		Thérapeutique.	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL ET PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie générale et comparée.	MM. COULOUMA	Bactériologie.	Mme ENJALBERT
Pathologie médicale.	LAPORTE (J.)	Physique médicale.	M. BRU
		Chimie médicale.	DOUSTE-BLAZY

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Histologie et embryologie ..	MM. PLANEL	Anatomie Pathologique. . . .	MM. BOUISSOU
Physiologie.	MONTASTRUC	Parasitologie.	RUFFIE (J.)
Anatomie	BASTIDE	Pathologie expérimentale ..	GLEIZES
Carcinologie	ESTRADE	Physiologie	BESSOU
Anesthésiologie	LARENG	Physique médicale	COMMANAY

AGREGES

Médecine générale	MM. MONNIER, RIBAUT, DELAUDE, CALAZEL, RASCOL	Chirurgie générale (suite) .	SARRAZIN
			MM. SOUQUET
		Médecine légale	GREZES-RUEFF
		Odontostomatologie	CADENAT (H.)
		Pédiatrie	BARDIER
Chirurgie générale	ENJALBERT, FICAT, PASQUIE	Dermatologie et syphiligraphie	DUPRE
		Hydrologie	DENARD
		Obstétrique	ESPAGNO

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie.	MM. THOMAS	Oto-Rhino-Laryngologie. . . .	MM. CLAUX
Ophtalmologie.	DEODATI	Pathologie chirurgicale	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle	MM. BOURBON	Matière Médicale.	MM. VINCENT
		Chimie pharmaceutique. . . .	BLANC
Pharmacie et pharmacodynamie	CAUJOLLE	Pharmacie galénique.	STANISLAS
		Zoologie	ROUX
Botanique et Cryptogamie .	Mme DULUCQ-MATHOU		

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL ET PROFESSEURS SANS CHAIRE

Pharmacie.	M. COUTURIER	Sciences Naturelles.	Mme CAUJOLLE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie	M. BREUILLAUD	Sciences Physiques.	M. PITET
Toxicologie	BROUSSY (G.)		

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal. . . . . M. ROCHE | Secrétaire . . . . . M. BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

Ce travail est dédié :

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE

LE PROFESSEUR A. VALDIGUIE

A MON PERE

LE PROFESSEUR P. VALDIGUIE

En témoignage de ma grande affection et de ma profonde gratitude.

Sa vie est une magnifique leçon de droiture, de dévouement, de probité scientifique et d'énergie.

Qu'il sache à quel point nous l'admirons et nous sommes fier de son exemple.

A MA MERE

A MA FEMME

A MON FILS MARC

A MES FRERES ET A MES SŒURS

A MES GRANDS-PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

En gage d'amour et d'affection.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR MERIEL

Professeur de Clinique médicale
Médecin des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'honneur

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR DARDENNE

Professeur de Thérapeutique
Médecin des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. RUFFIÉ

Professeur de Clinique rhumatologique
Médecin des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOUSTE-BLAZY

Professeur de Chimie biologique

MONSIEUR LE PROFESSEUR MONTASTRUC

Maître de Conférences agrégé de Physiologie

A Monsieur le Professeur BOULANGER

Professeur de Chimie biologique
à la Faculté de Médecine de Lille

Chevalier de la Légion d'honneur

Membre Correspondant de l'Académie de Médecine

A Monsieur le Professeur BISERTE

Professeur de Biochimie pathologique
à la Faculté de Médecine de Lille

A NOS MAITRES DE LA FACULTE
ET DES HOPITAUX

A NOS CHEFS DE CONFERENCE
D'EXTERNAT ET D'INTERNAT

A NOS AMIS
DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DE LA FACULTE
DE MEDECINE DE LILLE ET DE TOULOUSE

A NOS CAMARADES D'INTERNAT

A NOS AMIS

Avant-Propos

A l'occasion de ce travail, nous avons l'agréable devoir de présenter nos sentiments de reconnaissance aux Maîtres dont nous avons reçu l'enseignement et qui nous font aujourd'hui l'honneur de constituer notre Jury de Thèse.

M. le Professeur MÉRIEL, *à l'Ecole duquel nous sommes fier d'appartenir, a toujours été pour nous un Maître bienveillant et un guide précieux. C'est dans son service et sous sa tutelle, au cours de plusieurs stages d'Interne, que nous avons acquis et perfectionné nos connaissances cliniques. La plupart des malades que nous avons étudiés pour notre Thèse appartenaient à sa Clinique médicale et nous sommes heureux de remercier notre Maître de la confiance qu'il nous a témoignée, de ses conseils et de sa sollicitude. Nous l'assurons de notre respectueux attachement et de notre dévouement.*

M. le Professeur BOULANGER *a bien voulu nous accueillir très paternellement dans son Service et nous donner le sujet de ce travail. Nous avons vu chez lui ce que pouvait être le rendement d'une équipe bien soudée, dirigée par un patron attentif. Nous tenons à le remercier très vivement pour tout ce que nous avons appris chez lui, depuis que nous avons l'honneur d'être son élève. L'expression de nos vifs remerciements et de notre sincère gratitude n'est qu'un faible témoignage des sentiments que nous lui portons.*

M. le Professeur BISERTE *a été pour nous un guide et un modèle de tous les instants durant nos séjours à Lille. Il a bien voulu nous mettre au courant des techniques d'étude des protéines qu'il possédait et qu'il avait mises au point. Notre travail a bénéficié constamment de son aide et de ses conseils.*

Nous tenons à lui exprimer notre très vive admiration et notre respectueuse affection.

M. le Professeur DOUSTE-BLAZY, *après avoir été depuis notre enfance un aîné bienveillant et un ami très sûr est devenu notre Maître. Nous lui devons notre formation biochimique et nous apprécions chaque jour son amabilité, son sens du devoir et sa patiente rigueur. Sa présence dans ce Jury est pour nous une grande joie en raison de l'affection que nous lui portons.*

M. le Professeur DARDENNE *a été pour nous un Maître attentionné, qui nous a aidé à la préparation des concours. Il nous a maintes fois donné l'exemple, au cours d'un stage dans son service, de la simplicité, de la bonté envers les malades et d'un remarquable esprit clinique. Nous sommes heureux de le remercier de l'amitié qu'il nous a souvent manifestée et de lui dire notre respectueuse affection.*

M. le Professeur RUFFIÉ *nous a montré dans de nombreuses circonstances un intérêt cordial. Après nous avoir aidé pour la préparation de l'Internat, il nous a initié à la Rhumatologie et nous a permis d'apprécier la clarté de son enseignement, de sa pensée et de son diagnostic. Nous l'assurons de notre respectueux et fidèle attachement.*

M. le Professeur MONTASTRUC, *après avoir été notre chef de conférences d'Externat et nous avoir appris les fondements de la Physiologie, nous a toujours manifesté une amicale sympathie. Nous sommes heureux de l'assurer de notre respectueuse amitié.*

M. le Professeur RISER *qui a toujours été un Parrain très affectueux a été à deux reprises un Patron très bienveillant dont la clarté d'esprit, la rigueur scientifique, la bonté auprès des malades sont restées dans notre mémoire. Nous tenons à lui dire notre fidèle et respectueuse affection.*

Nous sommes heureux de remercier tous ceux qui nous ont apporté leur aide pour l'élaboration de ce travail :

— *Au Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine de Lille, en particulier* M. HAN, M^lles HALLET, DEVYS *et* VANDEWALLE.

— *Au Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine de Toulouse, tout spécialement* M^lles FOURCADE, MÉRIC *et* M. PONS.

— Le Docteur A. FOURNIÉ *qui nous a, en toutes circonstances, manifesté sa solide amitié et signalé plusieurs des malades étudiés.*

— Le Docteur J.-F. de BOISSEZON *qui a eu la gentillesse de nous céder des échantillons d'anti-sérums.*

— M^lle ADAM *qui a bien voulu se charger d'un certain nombre de lyophilisations.*

— M. COURRECH *dont nous avons utilisé les talents de dessinateur.*

Plan

Introduction

Historique.

PREMIERE PARTIE

LA NOTION DE GLOBULINES IMMUNES OU GLOBULINES DU SYSTEME GAMMA

1. — **L'hétérogénéité des γ-globulines.**

A) Les données de l'électrophorèse.

B) L'apport des méthodes de fractionnement du plasma et de l'ultracentrifugation.

C) L'immunoélectrophorèse.

D) La chromatographie sur cellulose.

E) Fractionnement par réduction.

2. — **Comparaison immunochimique des globulines immunes.**

A) La multiplicité des déterminants antigéniques de la γ-globuline.

B) Parenté immunochimique des globulines γ, B_{2a} et β_{2m}.

C) Conclusion. La notion de système γ ou de globulines immunes.

DEUXIEME PARTIE

DONNEES ACTUELLES SUR LES PROTEINES MYELOMATEUSES

Chapitre I. — La dysprotéinémie du myélome.

A) **Aspects physicochimiques.**

1° Les données de l'électrophorèse.

2° Les données de l'ultracentrifugation.

3° Les résultats chromatographiques.

4° La cryo-précipitation.

B) **Aspects chimiques et biochimiques.**

1° Composition en amino-acides.

2° Nature des groupements α-aminés terminaux.

3° Teneur en glucides.

4e Teneur en lipides.

5e Etude des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique et des fragments fournis par réduction.

C) **Aspects immunologiques.**

1° Les résultats classiques.
2° Les données de l'immunoélectrophorèse.
3° Propriétés immunologiques et hydrolyses enzymatiques.

D) **Aspects physiopathologiques et nosologiques.**

1° Plasmocytes et globulines myélomateuses.
2° Rapports entre la dysglobulinémie du myélome et les autres dysglobulinémies malignes.

Chapitre II. — Les protéines de Bence-Jones.

A) **Propriétés physicochimiques.**

1° La thermosolubilité.
2° Purification et cristallisation.
3° Les données de l'électrophorèse.
4° Les données de l'ultracentrifugation. Poids moléculaire.
5° Chromatographie sur cellulose.

B) **Propriétés chimiques et biochimiques.**

1° Composition en amino-acides.
2° Nature des groupements terminaux.
3° Teneur en glucides et en lipides.
4° Etude des peptides libérés par hydrolyse enzymatique.

C) **Propriétés immunologiques.**

1° Etude immunochimique.
2° La détection immunologique.
3° Le problème de la spécificité des protéines de B.-J.

D) **Problèmes physiopathologiques.**

1° Origine des protéines de B.-J.
2° Etudes isotopiques sur la synthèse et l'excrétion des protéines de B.-J.

Chapitre III. — Rapports entre syndromes biochimique et clinique.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre I. — Présentation des observations.

— Etude clinique.
— Etude biologique, électrophorétique et immunoélectrophorétique.

Chapitre II. — Isolement des protéines myélomateuses.

A) **Protéines sériques.**

— Techniques chromatographiques.
— Critères de pureté.

B) **Protéines de Bence-Jones.**

Chapitre III. — Etude des groupements N-terminaux.

A) **Méthodes de détermination.**

B) **Résultats.**

Chapitre IV. — Hydrolyse enzymatique
des protéines myélomateuses.

A) **Méthodes d'hydrolyse.**

B) **Méthodes d'étude des produits d'hydrolyse enzymatique.**

1° Séparation électrochromatographique des peptides.
2° Etude immunologique des hydrolysats.

Conclusion.

Introduction

Bien connu depuis quelques années grâce aux développements de la radiologie, des examens de moelle sternale et des électrophorèses en pratique clinique courante, le myélome multiple des os ou maladie de KAHLER, se caractérise par :

— la banalité des aspects cliniques de début, dominés par des douleurs de topographie variable suivant la localisation du processus ;

— l'importance des problèmes que posent, sur le plan de la pathologie générale, la fréquence des atteintes rénales et, sur le plan biochimique, l'origine des protéines pathologiques.

Trois éléments fondamentaux permettent de l'individualiser nettement :

— *un élément anatomique :* présence de nombreuses tumeurs parmi lesquelles aucune ne semble réaliser un foyer primitif, avec prolifération d'éléments plasmocytaires ;

— *un élément évolutif :* évolution toujours grave, d'allure maligne, à la frontière des états cancéreux et des leucoses, faisant aussi discuter de ses relations avec les réactions plasmocytaires des cancers osseux ;

— *un élément biochimique :* troubles humoraux fondamentaux faits d'une hyperprotéinémie de type globulinique et souvent d'une protéinurie particulière, la protéinurie de Bence-Jones.

C'est cette dysprotéinémie ou dysprotéinose du myélome que nous envisagerons en rapportant les données actuelles que nous possédons sur les globulines myélomateuses et les protéines de BENCE-JONES, puis en décrivant nos recherches personnelles sur ces substrats.

Historique

Sans insister sur les diverses étapes de la connaissance clinique et anatomo-pathologique du myélome multiple des os, nous nous attacherons surtout à préciser l'évolution des idées concernant le syndrome biochimique de la maladie.

Celle-ci, décrite pour la première fois, semble-t-il, par Watson et Mac Intyre en 1848, a été abordée avant tout, sur le plan biologique, par Sir Henry Bence-Jones. Ce dernier en effet, examinant l'urine du malade de Watson, autopsié ensuite par Mac Intyre, y décela la présence d'une « matière animale » qui, précipitant à une certaine température, disparaissait à température plus élevée.

Kühne, en 1869, retrouva, chez un malade qu'il estimait atteint d'une ostéo-malacie, la protéine signalée par Bence-Jones. Il la considéra comme voisine des produits d'hydrolyse pepsique des protéines ou albumoses et la dénomma « albumose de Bence-Jones ».

Rustitsky, élève de Von Recklinghausen, décrivit de nouvelles observations de tumeurs osseuses multiples avec fractures et déformations.

C'est cependant Kahler (183) (*), en 1889, qui présenta la première véritable synthèse anatomo-clinique de la maladie en insistant sur l'association entre les tumeurs osseuses et la protéinurie de Bence-Jones. Son nom est justement resté attaché au myélome multiple des os.

Wright, en 1900, parvint à réunir divers tableaux cliniques de l'affection en y découvrant un élément commun, le plasmocyte, annonçant ainsi une période fructueuse d'investigations histologiques. En 1904, Askanazy décrivit le premier cas de myélome associé à une amyloïdose.

En 1905, Abderhalden et Rostoski (1) entreprirent les premières études antigéniques sur la protéine urinaire de Bence-Jones.

Glaus (131), en 1917, signala l'association simultanée d'un myélocytome, d'une protéinurie de Bence-Jones et d'un amyloïdose, association qui sera longtemps considérée comme caractéristique.

Sur le plan biologique, l'hyperprotéinémie avait été signalée dès 1889 par Ellinger ; cette notion fut reprise par Hopkins et Savory (169), Perlzweig (271), Magnus-Levy (208), Carnot et

(*) Les numéros entre parenthèses correspondent à l'ordre alphabétique des références bibliographiques.

Bénard (50), qui soulignèrent la nature globulinique de l'hyperprotéinémie et tentèrent de préciser la constitution de la protéine urinaire thermosoluble.

Cependant il fallut attendre les progrès acquis sur les méthodes de fractionnement et la constitution des protéines pour voir se développer l'étude précise du syndrome humoral de la maladie. En particulier l'introduction par Tiselius des méthodes électrophorétiques permit de faire avancer largement la connaissance des perturbations sériques.

Ainsi en 1939, Longsworth (201) rapporta les premières analyses électrophorétiques du sérum de 3 cas de myélomes, à la suite de l'observation d'un pic homogène dans la région β. L'année suivante Kekwik (185) observa des anomalies tantôt dans la région des γ-, tantôt dans la région des β-globulines.

Apitz (10) décrivit magistralement l'ensemble des manifestations morphologiques du tracé électrophorétique des protéines du sarcome plasmocytaire et insista sur les anomalies qualitatives de ces protéines qu'il appela « paraprotéines ».

Gutman (147) en 1948, Adams (3) l'année suivante, publièrent leurs constatations sur de nombreux cas, alors qu'en France les travaux les plus importants furent ceux de Delbarre (75) (76), Wiedman (379) et Soulier (351) (353).

Par la suite, les recherches se multiplièrent, parmi lesquelles on peut citer à l'étranger, celles de Conn (61), Griffiths (142), Reiner (308), Osserman (253) (254) (255), Owen (262) (263) (264), Kyle (193) et *en* France, celles de Creyssel (65) (66) (68) (69), Serre (338), Warter (375), Fauvert (109), Marchal (214) et Croizat (71).

Mais rapidement l'électrophorèse simple fut insuffisante, et les investigations se dirigèrent vers la composition chimique, l'ultracentrifugation des protéines anormales et les techniques immunologiques ou immunoélectrophorétiques, inaugurées par Grabar et Williams (137) (138) et reprises ensuite par Scheidegger (318) (319) (320 et Heremans (161) (162) notamment.

L'ensemble de ces travaux, les résultats fournis par la chromatographie des protéines sériques et l'étude des peptides obtenus par hydrolyse enzymatique, forment maintenant un tout, certes encore bien incomplet, mais qui permet de mieux connaître la séméiologie du myélome multiple.

Ce sont ces diverses données que nous essayerons de regrouper, non sans avoir au préalable rappelé la notion de globulines immunes ou globulines du système gamma.

PREMIÈRE PARTIE

La notion de globulines immunes ou globulines du système gamma

PREMIERE PARTIE

La notion de globulines immunes ou globulines du système gamma

L'électrophorèse de Tiselius avait montré que la fraction lente ou fraction γ des protéines plasmatiques paraissait porteuse, chez l'homme et les animaux, de l'activité anticorps, ce qui incita un grand nombre de chercheurs à en préciser la constitution exacte.

I. — L'HETEROGENEITE DES GAMMA-GLOBULINES

Les globulines immunes constituent une famille hétérogène de glycoprotéines dont l'obtention est relativement aisée grâce à la méthode de fractionnement à l'éthanol de Cohn où elles se localisent principalement dans la fraction II et à la précipitation à 33 % de saturation en sulfate d'ammonium.

L'hétérogénéité du groupe fut démontrée par plusieurs méthodes :

— électrophorèse libre,
— fractionnement du plasma et ultracentrifugation,
— techniques immunologiques et immunoélectrophorétiques,
— chromatographie sur cellulose à pouvoir d'échange ionique.

a) Les données de l'électrophorèse.

Dès le début de l'application de celle-ci, on constata que le pic des globulines gamma ne pouvait être résolu par une courbe de Gauss, comme les autres pics α, β et albumine, car il présentait un aplatissement, témoignant sans doute d'une hétérogénéité, avec prépondérance des constituants les plus lents. Deutsch (78) prépara une fraction protéique à mobilité plus grande que le sommet γ classique, et dès lors apparurent les termes de γ_1- et γ_2- globulines, la première étant la plus rapide. La dénomination β_2-globulines fut employée par l'école de Cohn pour désigner certaines fractions de mobilité intermédiaire entre les zones β et γ.

b) L'apport des méthodes de fractionnement du plasma et de l'ultracentrifugation.

Oncley et coll. (252) obtinrent par fractionnement à l'éthanol selon la méthode 9 de Cohn des γ -globulines semblant très pures. Wallenius (374), étudiant en ultracentrifugation les constantes de sédimentation des différentes fractions électrophorétiques du sérum humain, montra que les « γ-globulines » comprenaient d'une part un constituant majeur de constante $S_{20} = 7$, correspondant aux pro-

téines isolées par Oncley, et d'autre part un deuxième composant, macromoléculaire, de constante $S_{20} = 19$, isolé par Müller-Eberhard (234) et dénommé γ_1-macroglobuline.

Enfin Heremans (160) isola par précipitation zincique suivant la méthode 12 de Cohn modifiée, une troisième protéine pure, la β_{2a} -globuline.

c) **L'immunoélectrophorèse.**

Introduite par Grabar et Williams en 1953 (137), elle permit à ces auteurs de révéler tout d'abord, par la longueur du trait de précipitation, l'existence d'une famille de γ -globulines, de constitution antigénique identique mais de mobilité électrophorétique différente. Puis elle montra deux nouvelles lignes de précipitation en zone β_2, correspondant aux β_{2a} - et β_{2m} -globulines (Williams et Grabar) (382), (Scheidegger et Roulet) (319).

Enfin l'immunoélectrophorèse permit de découvrir également l'existence d'une quatrième protéine dans ce groupe, appelée β_{2B} dont l'importance paraît moindre à l'heure actuelle.

d) **Chromatographie sur cellulose à pouvoir d'échange ionique.**

Les celluloses à pouvoir d'échange ionique telles que la di-éthyl-amino-éthyl-cellulose (DEAE-cellulose) ou la carboxyméthyl-cellulose (CM-cellulose) permettent de séparer diverses protéines plasmatiques.

Leur utilisation, à la suite de Peterson et Sober (275), a permis à Fahey et coll. (101), Biserte et coll. (33) (157) de retrouver l'hétérogénéité des globulines immunes que révélait parfaitement l'immunoélectrophorèse, mais aussi d'obtenir des fractions pures, bons substrats pour les études ultérieures de structure.

e) **Fractionnement en sous-unités par réduction.**

Constatée pour la première fois par Deutsch (82) pour des macroglobulines, la dissociation des γ-globulines normales en sous-unités par réduction des ponts disulfure, a été reprise récemment.

Ainsi Franek (119) sur des γ-globulines de différentes espèces animales, Edelman et Poulik (95), Phelps et coll. (278) sur des γ humaines, ont pu fragmenter ces molécules par action du mercaptoéthanol, de la cystéine ou de l'urée 8M. Les radicaux SH-libres sont bloqués par alkylation pour éviter une recombinaison. La séparation peut ensuite se faire par chromatographie sur CM-cellulose ou par électrophorèse en gel d'amidon, montrant une bande diffuse en avant de 2 bandes étroites et homogènes.

De ces expériences on peut déduire que les γ-globulines sont constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques ; la liaison entre elles se fait — non par une copule glucidique, ni par liaison peptidique — mais par pont disulfure et par d'autres faibles forces de liaison : des unités 7S réduites et alkylées peuvent encore se dissocier réversiblement en sous-unités plus petites sous l'action de tampons de faible molarité et de pH acide (Deutsch et Greenwood) (84).

2. — COMPARAISON IMMUNOCHIMIQUE DES GLOBULINES IMMUNES

A) La multiplicité des déterminants antigéniques des γ-globulines.

Il est maintenant bien connu que les γ-globulines immunoélectrophorétiquement pures et bien définies ne constituent pas un antigène unique mais un ensemble de déterminants antigéniques.

Nous verrons plus loin en étudiant les protéines urinaires de Bence-Jones, qu'elles sont des molécules relativement petites portant seulement une partie des déterminants antigéniques des γ-globulines normales. Grâce à leur emploi, Burtin (44) puis Scheidegger et Buzzi (322) ont pu mettre en évidence jusqu'à cinq déterminants antigéniques gamma.

De plus le clivage enzymatique des γ-globulines par la papaïne a permis à Porter (284) (285) d'isoler trois fragments dont deux avaient conservé l'activité antigénique et avaient une structure peptidique similaire comme le montrent les hydrolyses chymotrypsiques de Gitlin et Merler (130). Ses expériences furent reprises par Heremans (162) qui observa que la papaïne libère effectivement des fragments porteurs de divers déterminants antigéniques ; ces fragments ont des mobilités différentes en électrophorèse, le plus lent étant par ailleurs quantitativement le plus important.

Une nouvelle preuve de la diversité antigénique des gammaglobulines est enfin apportée par la possibilité d'obtention en immunoélectrophorèse de lignes de précipitation dédoublées, même pour des sérums normaux, grâce à l'emploi de certains antisérums.

Enfin récemment, Franklin (120) (121), étudiant par diffusion en gel d'agar les fractions d'ultracentrifugation 7S et 19S des γ-globulines, a pu montrer la présence de groupes antigéniques spécifiques de la fraction légère 7S, absents dans les fractions les plus lourdes.

B) Parenté immunochimique des γ-, β_{2a}- et β_{2m}-globulines.

Les rapports entre les globulines γ, $\beta_2\alpha$ et β_{2m} furent entrevus dès les premières immunoélectrophorèses.

On peut penser que chacune des trois protéines possède des déterminants propres et qu'il en existe, en outre, qui sont communs deux à deux et peut-être même communs à tout le groupe.

a) *Déterminants spécifiques.*

Leur existence est clairement prouvée par les méthodes d'épuisement des antisérums, faisant par exemple disparaître seulement l'arc de la β_{2a}-globuline, lorsqu'on épuise un immunsérum polyvalent par cette protéine à l'état pur, ou encore en faisant persister cet arc β_{2a} lorsque l'antisérum global est absorbé par tous les antigènes sériques excepté l'antigène β_{2a}.

b) *Déterminants communs aux globulines γ et β_{2a}.*

Williams et Grabar (382), dès le début de l'immunoélectrophorèse, observèrent une fusion partielle des lignes de précipitation des

globulines β_{2a} et γ, suggérant une parenté antigénique entre ces deux molécules. Heremans, en 1958, retrouva ces faits par la technique de diffusion en plaque d'Ouchterlony (259).

c) *Déterminants communs aux globulines* γ *et* β_{2m}.

Des réactions d'identité partielle entre ces deux protéines furent montrées par l'étude des courbes de précipitation antigène-anticorps et par l'étude des arcs de précipitation en plaque d'Ouchterlony (Franklin et Kunkel) (120) ; ces résultats furent encore retrouvés par Heremans qui conclut à l'existence de déterminants antigéniques communs aux globulines γ et β_{2m}, mais absents dans la molécule β_{2a}.

d) *Déterminants communs aux globulines* β_{2a} *et* β_{2m}.

Les mêmes expériences pratiquées avec ces protéines montrent que des déterminants communs sont présents ici encore et, qu'en partie au moins, ils n'existent pas dans la molécule gamma.

C) Conclusion. La notion de système γ ou de globulines immunes.

Tous les auteurs soulignent la parenté immunologique entre les trois globulines γ, β_{2a} et β_{2m} comme supports d'anticorps.

Ainsi la β_{2m} représente dans le sérum des anticorps anormaux comme le facteur rhumatismal et les anticorps antithyroïdiens, des anticorps normaux comme les isoagglutinines anti A, anti B et Rh, les anticorps Wasserman et les anticorps des polysaccharides somatiques des coliformes.

Les γ-globulines 7S supportent les anticorps diphtériques, les anticorps d'*Hemophilus Pertussis* et des Antigènes H des *Salmonella*. Les anticorps contre l'Antigène O des *Salmonella* seraient localisés sur les β_{2a} et β_{2m}-globulines, de même que les anticorps du tétanos, des virus polio I et III qui ont une répartition plus diffuse.

Tout ceci permet donc de les grouper sous le terme de globulines immunes ou de globulines du système gamma, selon Heremans (162).

Il faut exclure de ce groupe d'autres substances jouant également un rôle dans l'immunité, comme le système properdine ou le complément. Celui-ci est nécessaire à la réaction antigène-anticorps et à l'action de la properdine. Il est constitué d'au moins 4 composants chimiquement distincts, C'_1, C'_2, C'_3, C'_4. Si l'un est de nature phospholipidique, trois sont de nature protéique : les β_{1C} et β_{1a} euglobulines jouent un rôle dans l'activité du complément (Müller-Eberhard et Nilsson) (236).

C'est dans ce système gamma que se situent les perturbations protéiques, les dysprotéinémies ou paraprotéinémies de la maladie de Waldenstrôm ou du myélome multiple.

DEUXIÈME PARTIE

Données actuelles sur les protéines myélomateuses

DEUXIEME PARTIE

Données actuelles sur les proteines myélomateuses

CHAPITRE PREMIER

La Dysproteinémie

L'hyperprotéinémie est très fréquemment rencontrée dans la maladie de Kahler : 70 à 75 % des cas, avec une valeur moyenne de 85 à 90 g p. 1 000. On sait qu'elle se caractérise par la présence dans le sang de protéines anormales, abondantes et homogènes, que l'on a coutume, depuis Apitz (10), de désigner sous le terme de « paraprotéines ».

Ce terme définissait alors, pour son auteur, des protéines étrangères au sérum normal ; mais lorsqu'il fut démontré que ces protéines avaient une spécificité immunochimique de gamma globulines normales, de multiples critiques s'élevèrent.

Pourtant Heremans (162), s'appuyant sur les dissemblances qui existent aussi, à côté de la parenté, entre ces protéines myélomateuses et les globulines normales, a conservé ce terme de paraprotéines.

Nous verrons que de nombreuses questions se posent à leur sujet :

— Sont-elles totalement étrangères, anormales, exclues du métabolisme physiologique ?

— Sont-elles une aberration localisée d'un constituant normal des globulines du système gamma ?

— Sont-elles identiques dans le sérum et dans l'urine ?

Il semble que l'on puisse répondre à quelques-unes de ces questions, au moins partiellement, grâce à un certain nombre d'arguments tirés d'études :

- physicochimiques,
- biochimiques,
- immunologiques.

A) ASPECTS PHYSICOCHIMIQUES

1) Les données de l'électrophorèse.

a) *Electrophorèse libre et électrophorèse de zone sur papier.*

Les premières expériences sur ce sujet (Longsworth) (201), (Kekwick) (185), (Gutman) (147), rapportèrent les tracés électrophorétiques de quelques cas de myélome ayant une fraction majeure de mobilité β ou γ, mais ne correspondant pas, même dans ce dernier

cas, à l'emplacement du sommet γ normal. L'urine contenait souvent une protéine de Bence-Jones (B. J.) dont la mobilité électrophorétique était variable.

Moore et coll. (229) démontrèrent peu après que des paraprotéines de type B. J. pouvaient exister dans le sérum.

En 1946, apparut avec Ludin la notion de myélome avec un sommet électrophorétique en position α_2, ce qui fut également retrouvé par Wuhrmann et coll. (385) et Sandkuller.

Adams (3) montra que les sommets électrophorétiques des paraprotéines étaient quelquefois minimes et que, dans ces cas, la protéinurie de B. J. était souvent présente ce qui souleva le problème de l'identité des protéines urinaires avec les paraprotéines sériques.

Les différentes mobilités rencontrées amenèrent alors Wuhrmann à proposer une classification des myélomes en types α, β ou γ, ces derniers étant les plus fréquents. Elle fut reprise par Rundles (314) qui admit en outre une certaine corrélation entre l'importance de la protéinurie de B. J. et la faiblesse de la paraprotéinémie ; toutefois en électrophorèse, la protéine urinaire était souvent plus rapide. Reiner et Stern (308) firent en 1953 les mêmes constatations.

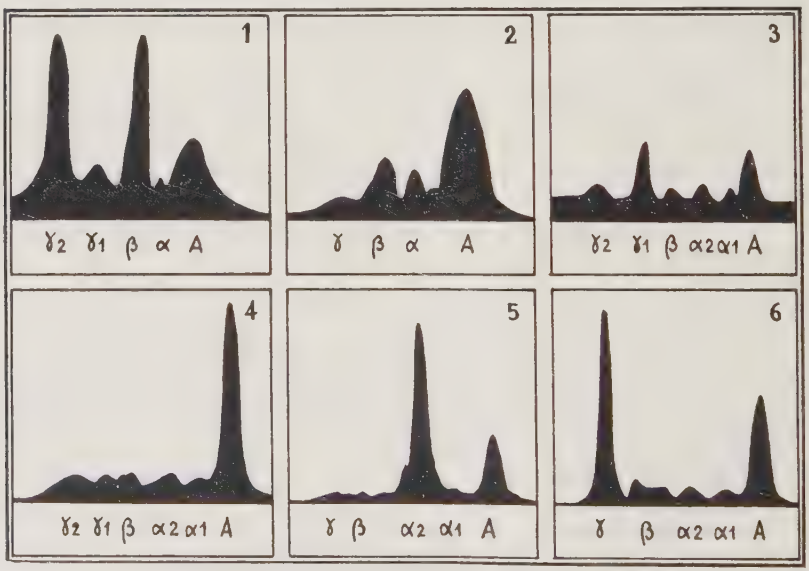


Figure 1. — Diagrammes d'électrophorèse en veine liquide de sérums myélomateux : 1 : β- γ myélome ; 2 : β myélome ; 4 : sérum normal ; 5 : α_2 myélome ; 3 et 6 : γ-myélome. D'après Polonovski et Delbarre (280), et Petermann (274).

Ces diverses données permettent de souligner les points suivants :

1. Les anomalies électrophorétiques sont en général notables et s'observent selon Putnam (299), Kubota (191), Rundles (314) et Rei-

NER (308) dans 70 à 80 % des cas ; de plus, lorsqu'il n'y a pas d'hyperprotéinémie, 25 % de ces sérums ont un tracé normal : CHARVILLAT (55), FAUVERT et HARTMANN (108), SELIGMANN (333).

2. Le pic du myélome se présente en électrophorèse sur papier sous la forme d'une bande étroite et dense, ayant comme caractéristique majeure sa grande homogénéité ; il est souvent quantitativement très important puisque 40 à 60 % des protéines totales peuvent migrer en un seul et homogène composant qui est la paraprotéine.

L'image électrophorétique reste en général permanente, immuable durant toute l'évolution de la maladie, en dehors d'une augmentation possible dans la proportion même de la protéine myélomateuse, (OSSERMAN) (257), (PUTNAM) (299), ou d'une éventuelle diminution, dans le cas de plasmocytome solitaire, après ablation de la tumeur.

Aucun traitement, aucun épisode pathologique intercurrent ne modifient ce tracé : d'ailleurs la grande faculté de synthèse de la paraprotéine doit être notée, après exsanguino-transfusion ou hémorragie (SOULIER) (351). Pourtant ont été notés les effets légèrement favorables de l'uréthane (314), de la cortisone et de ses dérivés.

3. La mobilité électrophorétique de la paraprotéine est variable et donne lieu à de multiples controverses du fait de son assimilation aux globulines normales qui ne servent en fait que comme points de repère. Il est en effet rare que la mobilité de la paraprotéine soit exactement superposable à celle de la globuline correspondante, (PUTNAM et UDIN) (291). Selon ces auteurs, la mobilité en électrophorèse libre des paraprotéines se situe, dans la plupart des cas, entre 0,5 et $3{,}5.10^{-5}$ $cm^2/volt^{-1}/sec^{-1}$.

Quoi qu'il en soit, le classement des myélomes en fonction de la mobilité électrophorétique des protéines anormales est précieux, sous la réserve que par « myélome β » ou « myélome γ », on entende évidemment myélome à paraprotéine β ou γ.

Classiquement on distingue :

— Un groupe γ, de mobilité inférieure à $1{,}5.10^{-5}$ en électrophorèse libre, en veine liquide ;

— *Un groupe* β, *de vitesse supérieure ou égale à* $1{,}5.\text{-}10^{-5}$.

a) *Les myélomes à paraprotéine de type* γ sont les plus fréquents : 60 % des cas de JANSEN (176), 72 % des cas de TEN THIJE (261). 56 % pour RUNDLES (315).

GRIFFITHS et BREWS (142) subdivisent cette classe en trois variétés : γ lentes, γ, rapides. Les pics de mobilité intermédiaire entre β et γ, correspondant donc aux γ rapides, sont appelés différemment suivant les auteurs : onde M par GUTMAN, onde X par SNAPPER, onde Z par WIEDERMANN.

b) *Les myélomes à paraprotéine* β sont moins fréquents : 15 % des cas de REINER (308). Ils s'accompagneraient peut-être d'une hyperprotéinémie moindre.

c) *Les myélomes à paraprotéine* α_2 sont exceptionnels. Les statistiques pourtant importantes de GUTMAN (147), RUNDLES (315), ADAMS (3), PUTNAM (299) n'en comprennent pas.

Cependant il existe quelques observations non contestables, Atamer (16), Owen (266), bien que d'après Heremans (162), il s'agisse seulement de paraprotéines β rapides.

d) Enfin quelques cas de *dysprotéinémie avec double perturbation* globulinique sont à signaler, Soulier (351), Szeinberg (360).

4. Le taux des γ-globulines normales est souvent très abaissé, en particulier dans certains cas de myélomes β où leur proportion est parfois nulle (Charvillat) (55).

5. *Le glucidogramme.* La révélation, sur les électrophorégrammes, des globulines anormales, par la méthode à l'acide periodique - réactif de Schiff, démontre constamment l'importance de la copule glucidique de ces protéines.

Cette caractéristique, signalée par Sachs (316), Rice (309), Havez (155), Sonnet et coll. (348), permet souvent de préciser la position exacte de cette fraction par rapport aux glycoprotéines normales.

Dans les cas où son taux, déterminé sur le protéinogramme, ne dépasse pas celui des constituants normaux de la zone électrophorétique considérée, la coloration glycoprotéique permet d'affirmer le caractère pathologique de cette globuline. Ainsi, l'intérêt de la réalisation du glycoprotéinogramme pour le diagnostic est particulièrement évident dans les observations avec hypo-γ-globulinémie et discrète augmentation des β-globulines sur le protéinogramme ; leur forte composante glycoprotéique n'apparaît qu'après coloration par l'acide periodique - réactif de Schiff (Hayem-Lévy) (158).

6. *Le lipoprotéinogramme.* Lors des colorations par le Noir Soudan, une fraction soudanophile apparaît exactement au niveau de la globuline anormale.

La présence de lipides se discute donc, d'autant que l'extraction par divers solvants organiques ne fait pas disparaître la soudanophilie (Havez) (155).

En résumé, si l'électrophorèse libre ou sur papier, permet très souvent d'appuyer ou d'affirmer le diagnostic de maladie de Kahler, elle ne permet pas en tout cas de supposer qu'il y ait la moindre relation entre l'hyperglobulinémie, la mobilité de la globuline anormale d'une part, et le type cellulaire des plasmocytes, l'atteinte osseuse, le déroulement clinique de la maladie ou même la protéinurie de B.-J. d'autre part.

b) *Electrophorèse en gélose.*

L'utilisation des gels d'agar-agar comme support électrophorétique a débuté avec Gordon en 1949 (136) et Bussard (48).

L'emploi de ce gel est particulièrement favorable car facile à préparer, très riche en eau et transparent. Il facilite donc les réactions de coloration, voire même des réactions enzymatiques, qui sont, en son sein très aisées. Il permet enfin et surtout, comme nous le verrons, les techniques immunoélectrophorétiques.

Dans le myélome multiple, l'électrophorèse en gel de gélose n'apporte guère de renseignements supplémentaires à ceux de l'électrophorèse sur papier.

Il faut toutefois citer à son actif, d'une part une moins grande dispersion des mobilités électrophorétiques des paraprotéines, ce qui donne un pic plus net et plus marqué et, d'autre part un effet de tamisage moléculaire discret qui a permis à Wieme (380) de constater, par exemple, que les macroglobulines ne pénétraient pas dans le gel mais restaient au point de dépôt.

L'avantage majeur de cette méthode électrophorétique est donc en résumé :

- de réaliser une bonne séparation, avec des bandes nettes et homogènes ;
- d'être surtout, le premier temps de l'immunoélectrophorèse.

c) *Electrophorèse en gel d'amidon.*

Si l'électrophorèse classique ou en gélose permet le plus souvent de caractériser, par son tracé, toute dysprotéinémie, elle n'apporte guère, nous l'avons vu, de renseignements intéressants sur la nature ou la constitution même des paraprotéines.

C'est dire l'intérêt d'une autre technique, l'électrophorèse en gel d'amidon, introduite en 1955 par Smithies (344) (345). Elle présente en effet un très haut pouvoir sélectif, sans doute par phénomène de filtration, lié aux dimensions des pores du gel qui sont du même ordre de grandeur que les tailles moléculaires protéiques.

On obtient par cette méthode un grand nombre de fractions et l'on a pu dénombrer jusqu'à une quinzaine de bandes de mobilité différente.

On distingue successivement les zones de la pré-albumine, de l'albumine, des post-albumines, α_2 rapide, haptoglobine, zone α - β, α_2 lente, β-lipoprotéines et enfin γ-globulines en arrière du point de dépôt.

La première application aux dysprotéinémies semble due à Silberman (341) qui montra que les protéines myélomateuses migraient en gel alors que les macroglobulines n'y pénétraient pas et restaient au point de dépôt. Flynn et Stow (118), Owen, Got et Silberman (267) ont ensuite noté le comportement très différent en gel d'amidon des myélomes β et γ, ainsi que la possibilité d'une hétérogénéité dans ce milieu de la paraprotéine.

Ces résultats, non retrouvés par Engle (97) (99) sur les protéines sériques mais confirmés pour les protéines de B.-J. ont été bien observés en France par Creyssel (68), Fine (114) (115) et Marnay (215).

On constate ainsi que :

— Dans les myélomes de type γ, les constituants anormaux occupent des positions « gamma » lentes ou surtout « gamma » rapides avec rarement une localisation dans la région γ médiane, et sans hétérogénéité dans ce groupe γ.

— Dans les myélomes de type β, les faits sont plus complexes car les globulines myélomateuses β ne se situent pas dans la zone des β globulines de SMITHIES, mais dans la zone α - β (qui est celle de l'haptoglobine), dans la zone α_2 ou dans la zone des β-lipoprotéines. Souvent apparaissent plusieurs bandes anormales que ne déce-

FIGURE 2 — Electrophorèse en gel d'amidon de sérums myélomateux. — A la partie supérieure, sérum normal avec ses diverses fractions. (Il y a dans cet exemple, prédominance de l'haptoglobine dimère Hp II.) — 1 : Myélome γ rapide ; 2 : Myélome γ lent ; 3 : Myélome β_2 ; 4 : Myélome β_1 ; 5 : Myélome α_2. D'après CREYSSEL et FINE (68).

lait pas l'électrophorèse libre ou sur papier : trois bandes par exemple dans un cas de FINE (114) et il semble que cette hétérogénéité

soit justement caractéristique des $\beta_2\alpha$-myélomes (Fine et Creyssel) (115).

— Dans les rares α-myélomes enfin, la mobilité en gel d'amidon peut être grande, le constituant anormal migrant par exemple dans la zone des post-albumines (Fine et Creyssel) (114).

— Parfois, la méthode de Smithies apporte un argument positif au diagnostic lorsqu'elle décèle ou permet de mieux révéler des anomalies qui n'apparaissaient pas ou étaient faiblement caractérisées par les autres méthodes (électrophorèse classique - immunoélectrophorèse).

— L'électrophorèse en gel d'amidon a aussi un grand intérêt dans l'étude des sous-unités de globulines myélomateuses libérées par réduction.

Edelman et Poulik (95) (96), utilisant le mercaptoéthanol comme agent réducteur, puis l'iodoacétamide pour bloquer les radicaux SH formés, ont noté de grandes différences avec les γ-globulines normales. Celles-ci donnent, dans le gel, deux bandes étroites puis une longue bande diffuse.

Les protéines anormales au contraire ont des bandes rapides, étroites, homogènes, distinctes, qui reflètent l'individualité de chacune de ces protéines. Si les bandes lentes ont parfois la même mobilité que les bandes γ normales, par contre les bandes rapides sont toujours particulières, comme le montre la figure 4.

Donc en résumé, l'électrophorèse en gel d'amidon apporte deux avantages :

— Grand pouvoir de sélection semblant lié aux dimensions et aux formes moléculaires ;

— Révélation de l'hétérogénéité des protéines anormales dans certains cas ; il est intéressant alors de connaître les rapports existant avec l'hétérogénéité possible en ultracentrifugation.

2) Les données de l'ultracentrifugation.

L'ultracentrifugation de Svedberg est fondée sur la constance de la vitesse de sédimentation des diverses fractions protéiques selon leur taille et leur poids moléculaire, lorsqu'elles sont soumises à une centrifugation à grande vitesse, atteignant plusieurs centaines de milliers de *g*, dans un milieu de densité déterminée.

Les tracés normaux d'ultracentrifugation du sérum comportent selon Svedberg (359) et Pedersen (270), les ondes suivantes :

— une onde A, la plus importante, de constante de sédimentation $S_{20} = 4{,}5$ unités Svedberg et correspondant à l'albumine, de poids moléculaire 65 à 70.000.

— une onde X, très faible, corespondant aux lipoprotéines et de $S_{20} = 5{,}9$.

— une onde G, assez importante, de $S_{20} = 7{,}5$, définissant les globulines de poids moléculaire de 150 à 180.000.

— une onde minime enfin, due aux composants lourds du sérum, de $S_{20} = 18$ à 20, identifiés ensuite aux α_2- et β_2-macroglobulines (Filitti-Wurmser) (112).

Les premières analyses en ultracentrifugation de sérums myélomateux sont dues à Mac Farlane (205) qui rechercha sans succès par cette méthode, la présence de protéines de Bence-Jones dans le sérum; cependant il remarqua que, sur deux sérums, l'un avait une paraprotéine de constante de sédimentation égale à celle des γ-globulines normales, 7 S, alors que l'autre était hétérogène, avec des constituants plus lourds.

Ces constantes de sédimentation furent retrouvées par Kekwick (185) sur un γ-myélome : 7 S et un β-myélome : 9,5 S avec une nette hétérogénéité.

L'attention était ainsi attirée sur une relation possible entre la mobilité électrophorétique et les données de l'ultracentrifugation.

Par ailleurs, Packalen, puis Moore et coll. (229) mettaient en évidence dans le sang une fraction légère correspondant à la protéine de B.J., mais en quantité peu abondante et par la suite rarement retrouvée.

Les travaux de Riva et coll., Rundles (315), Waldenström (371), Putnam et Udin (291), Creyssel et coll. (69), montrèrent ensuite que les paraprotéines de mobilité γ avaient une constante de sédimentation uniforme de 6 à 7 S (6,65 pour Putnam). Les paraprotéines de mobilité β, elles, se révélaient hétérogènes, leur constituant principal ayant une constante de 9,5 S avec, parallèlement, des constituants mineurs de 6,6, 11 et 12 S.

L'ultracentrifugation apporte donc des résultats intéressants que l'on peut avec Heremans (162), résumer ainsi :

a) Elle démontre clairement l'existence de deux classes principales de paraprotéines sériques.

— La plus fréquente, de mobilité le plus souvent γ en électrophorèse, a une vitesse de sédimentation comparable à celle des γ-globulines normales : 6,5 à 7 S environ.

— La deuxième classe, de mobilité généralement β, est hétérogène en ultracentrifugation et son constituant principal a une constante de 9,5 S. Cette valeur de 9,5 ne correspond ni à celle des β-globulines normales ni à celle des β-lipoprotéines. Putnam et Hardy (295) ont d'ailleurs démontré, par la technique d'ultracentrifugation de flottation de Gofman, que la β-globuline myélomateuse ne se comporte pas comme une lipoprotéine classique.

La protéine de constante de sédimentation 9,5 S est donc un composant pathologique non rencontré dans le sérum normal.

b) Elle peut démontrer, mais rarement, l'existence dans le sérum de paraprotéines plus petites que les γ-globulines normales et pouvant être de même taille que les protéines urinaires de B.J.

C'est là une notion importante puisque les travaux de Deutsch (82) (83) et de Putnam (296) ont montré que les macroglobulines de

la maladie de Waldenstrôm, dysprotéinémie voisine du myélome comme nous le verrons, pouvaient être dissociées par rupture des ponts disulfures intramoléculaires en sous-unités plus petites, de constante de sédimentation égale à 6,6 S, sous l'action d'agents réducteurs tels que le mercaptoéthanol ou la cystéine.

Il en est de même pour les protéines myélomateuses (Edelman et Poulik) (96) (289).

Nous verrons d'ailleurs les problèmes que posent ces paraprotéines de type B.J. sur le plan physiopathologique, en étudiant les rapports entre protéines sanguines et urinaires.

c) Enfin la mesure des constantes de sédimentation et de diffusion des globulines myélomateuses, pures et homogènes, permet aussi de déterminer leur poids moléculaire. Il est généralement voisin de 160 000, nombre donc tout à fait semblable à celui des γ-globulines normales.

Rundles, Cooper et Willett (315) ont trouvé, pour dix paraprotéines, des poids moléculaires de 120 à 200.000, avec une valeur moyenne de 160.000.

Toutefois, de grandes différences de taille et de poids moléculaires peuvent être enregistrées d'une protéine anormale à l'autre et même vis-à-vis des γ-globulines normales. D'ailleurs, pour que ces données soient vraiment validées, il faut employer diverses méthodes afin d'éliminer toute présence de composés di ou polymères et d'impuretés.

L'ultracentrifugation, en résumé, fournit des renseignements précieux sur le poids moléculaire et la vitesse de sédimentation des paraprotéines myélomateuses. Ses résultats permettent, en accord avec ceux de l'électrophorèse, de distinguer les myélomes γ et β. Nous verrons que les études immunologiques sont aussi en faveur de cette distinction.

3) Résultats de l'analyse chromatographique.

Introduite par Peterson et Sober (275) (276), la chromatographie des protéines représente, pour l'étude de celles-ci, une technique féconde. Effectuée sur des celluloses échangeuses d'ions du type di-éthyl-amino-éthyl (DEAE) ou carboxyméthyl (CM) cellulose, elle permet de séparer un grand nombre de protéines plasmatiques. La première étude de sérums pathologiques est due à Fahey et coll. (101). Ces auteurs démontrèrent ainsi que le chromatogramme d'un sérum myélomateux était caractéristique, avec un pic aigu et important, analogue à celui que donne le tracé électrophorétique. Bien que, dans un cas, ils aient observé un faible pic de γ-globulines normales, l'obstacle majeur est la superposition des γ-globulines dans la zone d'élution des protéines anormales.

La chromatographie du sérum permet aussi de distinguer myélome et macroglobulinémie, donnant des résultats analogues à ceux de l'ultracentrifugation, alors que l'électrophorèse en veine liquide ou sur papier est impuissante (Fahey et coll.) (102), (Ziff et Lospal-

LUTO) (394). En effet, probablement en raison de leur poids moléculaire, les macroglobulines sont éluées, dans la zone γ, plus tardivement que les protéines myélomateuses.

Un autre intérêt majeur de ces procédés chromatographiques est surtout la possibilité d'isolement des protéines anormales, aussi bien à partir du sérum de malades que du sérum ou des tissus de souris porteuses d'un plasmocytome expérimental (NATHANS, FAHEY et POTTER) (237).

Ainsi, l'utilisation successive de DEAE- puis de CM-cellulose réalise un isolement correct des paraprotéines. En effet, les globulines myélomateuses de type γ sont faiblement retenues sur DEAE-cellulose lorsqu'on élue la colonne chromatographique par un tampon de pH 8 ou 8,5 et de molarité faible (0,005 M). Inversement elles sont fortement retenues sur CM-cellulose lors d'une élution par un tampon à pH 5 ou 6 et de force ionique 0,01, alors que les autres protéines sériques sont facilement éluées.

Mais, nous l'avons déjà signalé, la séparation d'avec les γ-globulines normales est très souvent difficile, comme le montre la figure 3, où trois paraprotéines isolées par d'autres méthodes et homogènes en électrophorèse et ultracentrifugation, ont été comparées — quant à leur devenir chromatographique — avec des γ-globulines normales. Il y a une assez large superposition, et l'on se rend compte également :

— que la paraprotéine 1, la plus rapide en électrophorèse, est éluée la première ;

— que le pic des γ-globulines normales est large, empâté, ce qui est certainement une preuve supplémentaire d'hétérogénéité du groupe des γ-globulines, alors que les paraprotéines forment au contraire un pic mince et assez aigu.

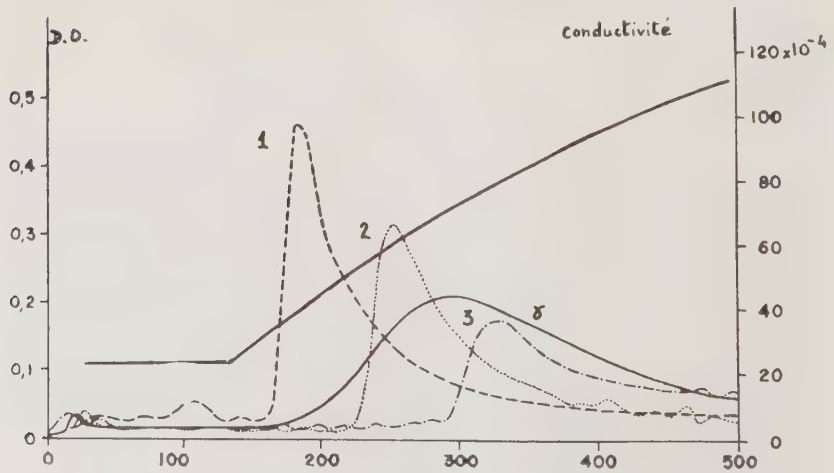


FIGURE 3. — Courbes d'élution chromatographique sur CM-cellulose de trois protéines myélomateuses (1), (2), (3) et de γ-globulines normales (γ). — En ordonnée, à gauche la densité optique à 278 $m\mu$, à droite la conductivité. En abscisse, les volumes d'éluat. D'après PUTNAM (306).

De toute façon, la chromatographie sur cellulose à pouvoir d'échange ionique constitue une excellente méthode d'isolement des protéines myélomateuses qui, après l'élution, doivent cependant être soumises à divers critères de pureté et d'homogénéité.

C'est à cette technique que nous nous adresserons pour l'isolement des paraprotéines de nos divers malades.

Avant de clore l'étude des propriétés physicochimiques des paraprotéines, un mot doit être dit sur les « cryoglobulines ».

4) La cryoprécipitation.

Une précipitation ou une gélification du sérum après un séjour plus ou moins prolongé à une température inférieure à 37° C, classiquement 4° C, caractérise bien les cryoglobulines qui représentent une classe très particulière de globulines anormales. Ici en effet, les méthodes classiques de séparation des globulines telles que le relargage au sulfate d'ammonium par exemple, deviennent pratiquement inutiles, la protéine précipitant spontanément lorsque la température est abaissée.

La première observation de cryoglobulinémie a été signalée en 1933 dans un cas de myélome multiple par Wintrobe et Buell ; par la suite la relative fréquence de la cryoprécipitation au cours des myélomes a été soulignée.

a) *Données physicochimiques.*

La présence d'une cryoglobuline est souvent une découverte de laboratoire fortuite, reconnue après coagulation du sang à 37°C puis maintien du sérum quelques heures à 4° C.

Le réchauffement à 37° C amène la dissolution du précipité ; il peut se reproduire de nouveau en abaissant la température. Le dosage approximatif peut être réalisé par pesée après lavage et purification du précipité.

— L'électrophorèse de zone sur papier ou en gélose permet de localiser cette protéine anormale. Elle migre en général au niveau des γ-globulines ou entre les β- et γ-globulines. La comparaison du sérum total et du sérum privé de la cryoglobuline par centrifugation à basse température, permet d'en déterminer le pourcentage. Quand il s'agit d'une maladie de Kahler, le tracé électrophorétique classique n'est pas modifié cependant par le phénomène de cryoprécipitation.

— L'ultracentrifugation montre que le poids moléculaire des cryoglobulines myélomateuses est très variable d'un cas à l'autre, bien que dans la majorité des cas la constante de sédimentation soit celle des γ-globulines, 6,6 S environ. Lorsqu'il s'agit d'une cryoglobuline au cours d'une maladie de Waldenstrôm, on observe souvent que sa constante de sédimentation est celle d'une macroglobuline.

— L'immunoélectrophorèse permet de leur attribuer le plus souvent une antigénicité gamma.

— La composition chimique est délicate à préciser car il est difficile de comparer les résultats entre des γ-globulines totales,

famille protéique, et une cryoglobuline myélomateuse, pouvant être une perturbation d'un seul groupe très limité des γ-globulines. Tout au plus peut-on citer quelques anomalies comme la présence d'hydroxyproline dans un cas de Mandema (213) ou l'absence de thréonine, de sérine et de méthionine (Polonovski et Delbarre) (279).

L'ensemble des autres données physiques ou chimiques caractérise les protéines myélomateuses elles-même et n'apporte rien de plus à l'étude des cryoglobulinémies.

b) *Données étiologiques.*

De la revue générale réalisée par Charmot et André (54), on peut conclure que l'apparition des cryoglobulinémies est généralement secondaire.

On les rencontre :

— Dans les affections malignes essentiellement : myélome multiple surtout (42 cas sur 222 rassemblés par Charmot et André) et le plus souvent γ-myélome. La cryoglobuline appartient à la globuline anormale elle-même. Sa présence pourrait peut-être expliquer certaines formes hémorragiques du myélome.

— On peut également les rencontrer dans les macroglobulinémies et dans une foule d'états pathologiques divers : maladies infectieuses et parasitaires, collagénoses, affections hépato-spléniques ou hématologiques.

— Quant aux cryoglobulinémies essentielles (24 cas dans la statistique de Charmot), elles doivent être discutées puisque dans cette revue générale, l'absence de certains examens, en particulier immunoélectrophorèse, ne permet pas d'exclure formellement le diagnostic de maladie de Kahler ou de Waldenstrôm. Dans certains cas d'ailleurs, le phénomène de cryoprécipitation peut simplement ouvrir la scène, l'apparition des signes classiques de l'affection causale étant plus tardive.

En résumé, la cryoprécipitation ou cryogélification est une propriété particulière que peuvent présenter certaines globulines et notamment les paraprotéines myélomateuses.

Elle ne constitue pas un cadre nosologique précis et il semble que le phénomène soit lié à la nature même de la molécule anormale, réalisant alors un exemple frappant de « maladie moléculaire ».

Dans ce sens vont les expériences de Heremans (162) qui a observé la disparition du phénomène de cryoprécipitation pour une cryoglobulinémie essentielle, sous l'influence d'agents réducteurs tels que la cystéine ou le mercaptoéthanol, qui rompent vraisemblablement des liaisons disulfures intramoléculaires. Cette rupture permettrait alors un « déroulement » de la molécule la rendant moins sensible à l'action du froid ; la cryoprécipitation est peut-être donc liée à un nombre et à une position anarchiques des liaisons S-S intramoléculaires (Biserte) (34).

B) ASPECTS CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

1) Composition en amino-acides.

L'étude de la composition en acides aminés des globulines pathologiques a été fréquemment abordée depuis quelques années, mais souvent par des méthodes critiquables et sans critères nets de pureté et d'homogénéité du substrat.

Les premières études valables ont été entreprises par Grisolia (143), appliquant le dosage microbiologique des amino-acides à des globulines anormales de myélome, isolées par relargage au sulfate d'ammonium. Ces protéines avaient des mobilités électrophorétiques variables suivant les cas cliniques, et étaient tantôt homogènes, tantôt hétérogènes en ultracentrifugation bien que, dans tous les échantillons, soit retrouvé un constituant 7 S environ.

Dans cette étude Grisolia note la ressemblance avec les γ-globulines normales : richesse en sérine et thréonine et absence de tout acide aminé particulier.

Les mêmes conclusions sont retrouvées par Mandema (213) sur une cryoglobuline, et par Putnam (299) : la composition des protéines myélomateuses est beaucoup plus voisine de la composition de l'ensemble des γ-globulines que de celle des autres protéines sériques. La prédominance de sérine, thréonine, acide glutamique et acide aspartique y est particulièrement nette. Cependant, en dépit de cette similitude globale, tous les auteurs concluent que des différences notables existent entre chaque spécimen de paraprotéine.

Ainsi Smith et coll. (343) analysent les amino-acides par chromatographie sur résine échangeuse d'ions et notent les différences significatives entre quatre globulines anormales surtout dans les taux d'arginine, lysine et leucine.

Havez, Biserte et coll. (157) préparant des globulines myélomateuses par chromatographie sur DEAE-cellulose, ont étudié la composition en acides aminés de diverses sous-fractions obtenues en découpant le pic d'élution et en les comparant avec des sous-fractions de γ-globulines normales, obtenues dans les mêmes conditions.

Ils notent un pourcentage nettement supérieur, par rapport aux témoins normaux, de thréonine, de sérine, d'arginine et d'acides dicarboxyliques (aspartique et glutamique) dans les sous-fractions correspondant aux globulines myélomateuses pures. Au contraire, les pourcentages de valine, de leucine, des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) et de la lysine sont très nettement diminués.

Dans les cas de cryoglobulines enfin, il faut signaler aussi quelques anomalies caractéristiques comme par exemple la présence d'hydroxyproline dans le cas de Mandema (213) et l'absence de thréonine, sérine et méthionine dans une des observations de Polonovski et Delbarre (279), comme nous l'avons déjà vu.

En conclusion, on peut dire qu'il existe différents types de globulines anormales dans le myélome. La plupart d'entre elles ont une certaine ressemblance avec les γ-globulines normales bien que

cette comparaison même doive être prudente car s'adressant à l'ensemble des γ-globulines, vaste famille protéique, alors que l'hyperglobulinémie myélomateuse correspond sans doute à l'augmentation isolée d'un groupe très défini et limité des γ-globulines.

2) **Nature des groupements α-aminés terminaux.**

A l'extrémité d'une chaîne peptidique d'une protéine un acide aminé possède un groupement α-aminé encore libre, par exemple :

$$H_2N - \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}} - CO - NH - \ldots$$

dont la détermination peut se faire par diverses méthodes dont celle, classique, de Sanger (317).

On a pu ainsi révéler l'hétérogénéité des γ-globulines normales et des anticorps d'espèces différentes (Mac Fadden et coll.) (204).

Ces γ-globulines normales renferment deux types de groupements N-terminaux libres en proportion non équimoléculaire : en moyenne 1,1 molécule d'acide aspartique et 1,8 molécule d'acide glutamique pour un poids moléculaire de 160.000.

Les données physicochimiques actuelles permettent de penser qu'il y a 2 à 3 groupements α-aminés terminaux libres par molécule de poids 160.000 environ.

La longueur moyenne des chaînes peptidiques constitutives correspondait donc à un enchaînement de 450 à 700 amino-acides avec un poids de l'ordre de 60 à 80.000 (Putnam) (306).

Ces méthodes ont permis de démontrer par contre la particularité habituelle des globulines anormales, pour lesquelles la détermination des groupements N-terminaux fournit des résultats différents dans les proportions d'acide glutamique notamment, ou dans la nature de l'acide aminé N-terminal.

On peut d'ailleurs distinguer, selon justement la nature de l'acide aminé terminal, avec Putnam (293) (300) (304) :

— des N-aspartyl-globulines,

— des N-glutamyl-globulines,

et dans ces deux cas si l'on retrouve respectivement l'autre acide dicarboxylique N-terminal, il peut être attribué à de petites traces de γ-globulines normales ;

— des N-aspartyl-N-glutamyl-globulines où les deux acides aminés sont rencontrés, formant chacun l'extrémité terminale d'une chaîne peptidique, mais en proportion différente (deux fois plus abondante) de celle des γ-globulines normales ;

— des N-leucyl-globulines enfin, où la leucine occupe la position N-terminale.

Les cryoglobulines étudiées par Putnam et Miyake (297), par Smith et coll. (343) et par Mac Farlane et coll. (205) peuvent être rangées dans l'un ou l'autre groupe.

Sur le plan quantitatif, on peut relever dans le travail de Putnam (304) les données suivantes :

— Dans le premier groupe, dépourvu d'acide glutamique N-terminal, il y avait 1 à 2 moles d'acide aspartique N-terminal. La mobilité électrophorétique était très variable, la constante de sédimentation toujours celle des γ-globulines normales et sur six cas, il y avait trois cryoglobulines ;

— Dans le groupe des N-glutamyl-paraprotéines, où se rencontrent 2 à 5 résidus d'acide glutamique, sans acide aspartique, la mobilité électrophorétique était également variable. Sur sept cas, quatre sédimentaient comme les γ-globulines normales, trois avaient un constituant majeur plus lourd de 9 à 11 S et enfin deux étaient des cryoglobulines ;

— Le troisième groupe, N-aspartyl, N-glutamyl-globulines, avait aussi une mobilité électrophorétique variable ; trois cas sur cinq étaient des cryoglobulines alors que trois également étaient hétérogènes en ultracentrifugation.

En résumé, il n'y a guère de relations entre mobilité électrophorétique et groupes N-terminaux ; l'hétérogénéité électrophorétique des γ-globulines normales, qui ne saurait s'expliquer par la seule différence dans les groupements N-terminaux, le laissait d'ailleurs prévoir.

Il n'y a pas non plus de relation, semble-t-il, entre la cryoprécipitation et la présence de tel ou tel amino-acide en position N-terminale.

Les paraprotéines du myélome se révèlent donc pathologiques par leurs acides aminés N-terminaux et par leur mobilité électrophorétique.

Ces caractères anormaux pourraient tenir à la surproduction abondante de substances présentes seulement à l'état de traces dans le sérum normal, et ceci bien que l'on ne puisse déceler, par exemple, de groupements N-leucyl terminaux chez un sujet sain.

Quoiqu'il en soit, la méthode de détermination des groupes α-aminés terminaux permet de se rendre compte, une nouvelle fois, de l'homogénéité des paraprotéines et aussi de leur individualité puisque différentes souvent dans leur acide aminé terminal.

3) **Teneur en glucides.**

Les premières analyses glucidiques portant sur des paraprotéines myélomateuses bien caractérisées sur le plan physicochimique et immunologique, ont été faites en 1953 par Lohss et ses collaborateurs (200). Ils trouvèrent un taux de glucides liés aux protéines plus faible que celui des γ-globulines normales. Ces analyses portaient sur des paraprotéines de mobilité électrophorétique γ.

Par contre, l'étude des paraprotéines de mobilité plus grande, β et α, révélait un taux de glucides bien supérieur à celui des γ-globulines normales. Ces résultats furent confirmés ensuite par de nombreux auteurs dont Sonnet (348), Osserman (255), Osserman et Lawlor (254), Rice (309), Sachs (316) qui utilisèrent la coloration à l'acide periodique-réactif de Schiff en électrophorèse sur papier.

Les résultats quantitatifs complets sont cependant encore assez peu nombreux : la composition de la copule glucidique des γ-globulines normales, servant d'élément de comparaison, est donnée par

Rosevear et Smith (312) et Müller-Eberhard et Kunkel (235). Ces auteurs trouvent, pour une molécule de poids 160.000, 8 à 10 résidus d'hexoses (galactose, mannose, 3:5), 10 résidus d'hexosamines (N-acétylglucosamine), 2 de fucose et un d'acide sialique.

Les résultats de Smith et coll. (343), de Müller-Eberhard et Kunkel (235) pour 12 cas, ceux de Maiorca (211) pour 2 cas et ceux de Nikkila (241) pour 15 paraprotéines, permettent de comparer les taux d'hexoses, hexosamines, fucose et acide sialique entre γ-globulines normales et globulines myélomateuses. Avec les réserves que l'on doit encore faire en comparant des γ-globulines, vaste famille hétérogène, et des protéines myélomateuses très homogènes au contraire, on peut cependant constater que les valeurs trouvées sont soit identiques, soit légèrement inférieures, soit assez nettement supérieures aux taux normaux, surtout pour les β-globulines myélomateuses. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux I et II.

	Hexoses	*Hexosamines*	*Acide sialique*	*Fucose*
γ normales (7 S) (1)	1,2	1,4	0,22	0,29
γ normales (2)	1,4	0,77	0,30	—
γ normales (5)	—	—	—	0,18
γ myélomateuses (3)	0,8 - 4,0	0,8 - 3,1	—	—
γ myélomateuses (4)	0,9 - 1,8	1,1 - 1,8	0,15 - 0,23	0,30 - 0,36
γ myélomateuses (2)	1,83	1,14	0,33	—
γ myélomateuses (5)	—	—	—	0,21
β myélomateuses (2)	2,90	1,02	0,70	—
β myélomateuses (5)	—	—	—	0,78

Tableau I : Composition glucidique en mg p. 100 de γ-globulines normales et myélomateuses. D'après (1) Winzler (384) ; (2) Nikkila et Pesola (241) ; (3) Smith et coll. (343) ; (4) Maiorca et Scarpioni (211) ; (5) Rosevear et Smith (312).

	Hexoses	*Hexosamines*	*Fucose*	*Acide sialique*	Hexosamines / *Hexoses*
γ normales	10,5	10,3	2,0	1,0	0,98
γ myélomateuses	9,5	8,9	2,1	1,0	0,98
β myélomateuses	24,3	19,7	2,6	3,1	0,81

Tableau II : Composition glucidique moyenne, en rapports molaires, de γ-globulines normales et de globulines myélomateuses de mobilité électrophorétique γ et β. D'après Müller-Eberhard et Kunkel (235).

On voit que les différences entre les globulines normales et myélomateuses sont mineures, en particulier pour les hexoses et hexosamines, ce qui est confirmé par de nombreux auteurs dont Goa (132) et Bollet (37).

Par l'étude de la composition glucidique des diverses fractions sériques, séparées par électrophorèse de zone sur chlorure de polyvinyle, Nikkila et Pesola (241) ont montré que les différences observées pour les protéines anormales ne sont pas plus importantes que celles des autres fractions.

L'augmentation diffuse des glucides liés représenterait donc une réponse générale au processus malin.

Pour l'acide sialique, le problème est plus complexe ; on sait que la spécificité de la réaction acide periodique - réactif de Schiff est liée principalement à la présence d'acide sialique dans la copule glucidique, Montreuil et Biserte (228). La nette positivité de la réaction au niveau de la globuline myélomateuse peut donc s'expliquer partiellement par l'augmentation quantitative du taux de celle-ci. La participation d'une anomalie de la copule glucidique peut aussi être envisagée mais il est impossible de la préciser de façon définitive devant le petit nombre de dosages rassemblés. De plus, les travaux de Rosevear et Smith (311), Dische et Gabriel (88), qui ont individualisé et isolé des glycopeptides, après hydrolyse papaïnique ou directement à partir de diverses fractions de Cohn, n'ont pas encore été appliqués aux protéines myélomateuses.

Enfin le problème est compliqué par le fait qu'il existe, à l'intérieur même des groupes et sous-groupes de γ-globulines, des variations dans la composition glucidique allant de 1,1 à 2,3 mg p. 100, Fahey et Horbett (103).

4) **Teneur en lipides.**

De même que les glucides sont facilement repérés sur les électrophorégrammes par la coloration à l'acide periodique - réactif de Schiff, on a pu constater, à la suite de Sachs (316) et Lewis (198), qu'une certaine coloration s'observait après traitement avec le rouge cérol ou le noir soudan, au niveau de la paraprotéine.

Alors que les lipides des protéines de B.J. ont été assez bien étudiés, rien n'apporte dans la littérature de grandes précisions sur la nature et la signification de ces lipides sériques.

Tout au plus relève-t-on dans le travail de Sachs et celui d'Havez (155), la persistance de la coloration après extraction des bandes par le réactif de Bloor (alcool absolu - éther 3/1) et par l'alcool ou l'acétone.

A la suite des travaux de Gross et Weicker (144), on admet que ces lipides ne correspondent pas à la β-lipoprotéine normale, mais représentent une copule lipidique adsorbée sur la paraprotéine et résistant à l'extraction acétonique. Elle serait un complexe lipoprotéinique riche en phospore lipidique.

Ceci nous amène à considérer un instant la question des lipides plasmatiques dans le myélome, sujet sur lequel la littérature abonde,

peut-être par le fait qu'a été remarquée, depuis longtemps, la rareté des lésions athéromateuses chez les myélomateux, elle-même en rapport possible avec l'abaissement des lipides sériques (Spain et coll.) (355).

Le cholestérol sanguin a été ainsi très étudié : Magalini et coll. (207), Nikkila (240), Schless (323), Weissman-Netter (377), Gaidano et coll. (128) ont observé des taux variables avec souvent un abaissement, quelquefois très important. Les β-lipoprotéines ont été également étudiées chez ces malades et Sachs (316), en 1954, notait déjà leurs grandes variations et l'absence de parallèlisme entre les anomalies protéiques et lipidiques. Weissman-Netter (377) retrouve des taux faibles de lipides, de phospholipides, de cholestérol, dans les fractions lipoprotéiniques α et β, mais aussi toujours cette absence de liaison apparente entre les métabolismes des lipides et des protéines anormales.

Burstein et Fine (43) notent enfin, par dosage opacimétrique des β-lipoprotéines après précipitation à l'héparine en présence de Cl_2Ca, qu'il y a souvent une chute très importante du taux des β-lipoprotéines, ce qui, selon ces auteurs, peut même représenter un argument en faveur du diagnostic de myélome, dans les cas limites.

Mais il faut aussi considérer un cas très particulier, celui du myélome avec hyperlipémie, observée surtout lors des myélomes de type β_{2a}, avec xanthomatose et élévation notables des β-lipoprotéines (Lennard-Jones) (196), (Heremans) (162). A l'électrophorèse, il y a superposition de la paraprotéine et de la β-lipoprotéine, soit par adsorption, soit par mobilité électrophorétique analogue, mais l'ultracentrifugation permet de séparer, de débarrasser le matériel protidique des lipides et il semble donc difficile, dans ces cas, de parler de paraprotéine de type gluco-lipo-protéique.

Le problème reste entier et il est malaisé de dire s'il existe vraiment une copule lipidique dans la structure de la paraprotéine myélomateuse ou s'il s'agit, au contraire, d'une lipoprotéine adsorbée. De même les perturbations du métabolisme lipidique restent inexpliquées.

5) Etude des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique et des fragments obtenus par réduction.

Si l'on sait que la détermination complète de la séquence structurale de l'insuline ou de la ribonucléase, de poids moléculaires respectifs 5.734 et 14.000, a été laborieuse, on comprend l'extrême difficulté de l'étude structurale des grosses molécules des paraprotéines.

Un moyen commode pour aborder leur structure et pour déceler les anomalies de séquence des amino-acides dans les chaînes de γ-globulines normales ou pathologiques, est l'analyse des peptides formés par l'hydrolyse enzymatique.

Alors que les travaux de Porter (284) (285), utilisant comme substrat des γ-globulines de lapin et comme enzyme la papaïne, sont essentiellement orientés vers des données immunologiques, les études structurales sont surtout l'œuvre de l'école de Putnam qui analyse

les peptides libérés lors de l'hydrolyse trypsique, par chromatographie sur résine échangeuse d'ion du type Dowex.

L'analyse qualitative et quantitative des courbes d'élution permet de déceler des ressemblances ou des anomalies de structure entre les divers substrats, grâce à l'absence de quelques pics peptidiques ou à la présence de nouveaux.

Ainsi Fried et Putnam (125) ont pu démontrer qu'il existait de grandes similitudes entre les tracés chromatographiques de γ-globulines normales et myélomateuses car de nombreux peptides apparaissent en même place et leur étude quantitative apporte des résultats très voisins. Toutefois quelques différences significatives apparaissent pour certains peptides, qui n'existent que dans les protéines normales ou au contraire dans les protéines myélomateuses. Bien que ces expériences aient été conduites avec des γ-globulines, famille protéique hétérogène d'une part et des protéines myélomateuses très homogènes d'autre part, on peut penser que certaines régions de la chaîne peptidique sont différentes dans les deux types de protéines. Les anomalies peuvent porter sur le remplacement, l'addition ou l'élimination d'un ou de plusieurs acides aminés à l'intérieur des chaînes.

Cependant à côté de ces hydrolyses trypsiques, les clivages par la papaïne de Porter ont été repris par Hsiao et Putnam (172) et Putnam (307). Ils conduisent à des fragments polypeptidiques de constante de sédimentation 3,5 S et à un résidu protéique non attaqué sédimentant toujours avec la même constante que la protéine initiale, c'est-à-dire 6,5 à 7 S. Ici encore se pose le problème de l'identité de certains peptides issus des γ-globulines normales et des paraprotéines.

En chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose, trois fragments sont élués et Deutsch, Stiehm et Morton (85) notent :

— D'une part, dans la fraction A, une plus grande richesse en phénylalanine et une moins grande quantité de lysine que dans la protéine non hydrolysée ; dans les fractions B et C, plus de méthionine et moins d'alanine et glycocolle.

— D'autre part, le fragment conservant la constante de sédimentation initiale 6,6 S, peut être converti en fragments 3,5 S par l'action d'agents réducteurs comme le mercaptoéthanol ; le même fait est signalé par Cebra et coll. (51) pour les globulines de lapin.

Les fragments libérés par la papaïne ne semblent pas identifiables avec les sous-unités obtenues par réduction. Ils en sont cependant des portions. Ceci est renforcé par le fait que les 2 fragments obtenus par protéolyse et ayant une activité anticorps, sont unis par un seul pont disulfure (Nisonoff et coll.) (242).

La fragmentation des γ-globulines en sous-unités, sous l'influence d'agents divers coupant les ponts disulfures et rappelant les résultats de Deutsch (82) sur les macroglobulines, constitue un sujet d'actualité dont l'intérêt est surtout lié à l'obtention de fragments plus petits que la molécule initiale.

On peut ainsi citer les travaux récents de Nisonoff et coll. (244), Franek (119), Phelps et coll. (278), Edelman et Poulik (96) (289).

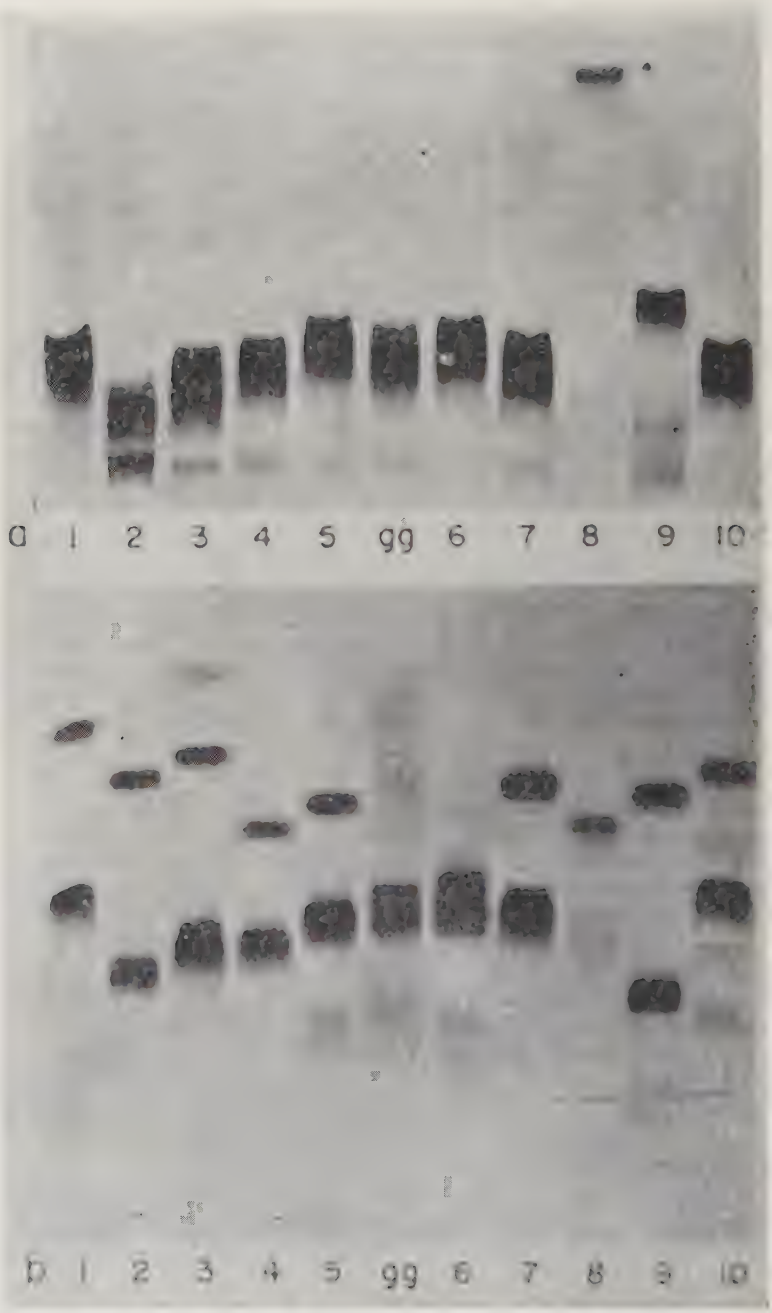


FIGURE 4. — Comparaison par électrophorèse en gel d'amidon de γ-globulines normales et myélomateuses : a : avant réduction et alkylation ; b : après réduction et alkylation (gg : γ-globulines normales ; 1 à 10 : globulines myélomateuses). D'après POULIK et EDELMAN (289).

La séparation des sous-unités obtenues par réduction est réalisable en gel d'amidon comme le montrent les figures 4 et 5 où sont comparées γ-globulines normales et globulines myélomateuses avant et après réduction, ainsi que paraprotéine et protéine de B.J. Ainsi, dans le myélome, apparaîtrait peut-être un défaut dans le contrôle et la spécificité de production et de liaison entre les divers groupements SH et les multiples sous-unités.

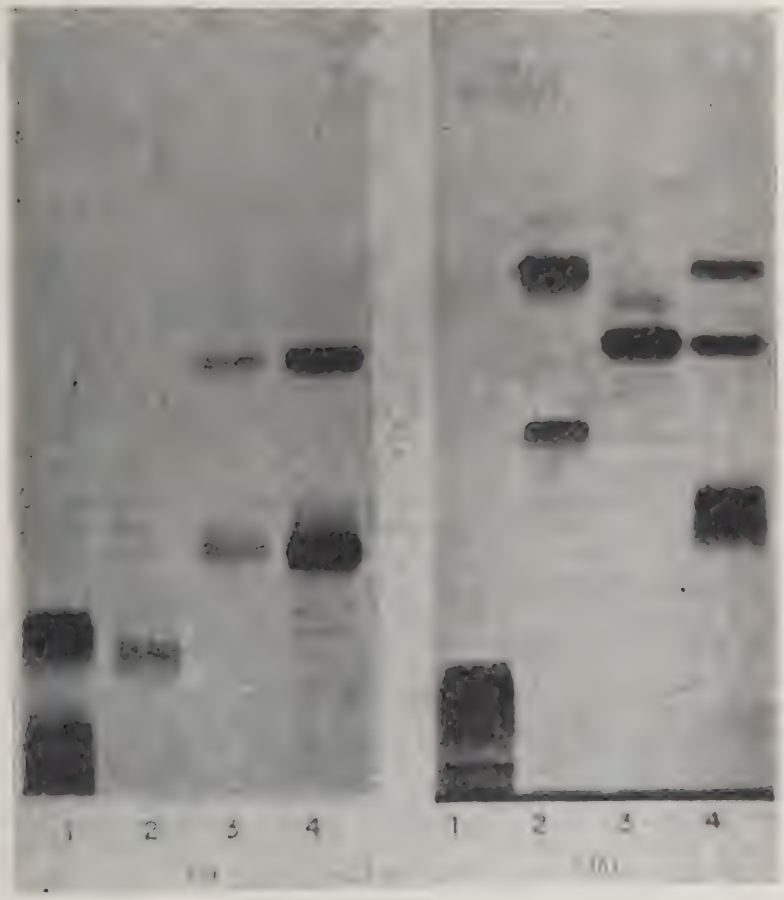


FIGURE 5. — Comparaison par électrophorèse en gel d'amidon des globulines myélomateuses et des protéines de Bence-Jones de deux malades (a) et (b) : En 1 : paraprotéine sérique non traitée ; 4 : paraprotéine réduite et alkylée ; 2 : protéine de Bence-Jones non traitée ; 3 : protéine de Bence-Jones réduite et alkylée. D'après POULIK et EDELMAN (289).

Et si ces données se vérifient, on pourrait alors définir, avec BISERTE (34), le myélome multiple comme une maladie moléculaire

d'un groupe déterminé de la famille des γ-globulines, comparable en somme aux hémoglobinoses.

Cependant, dans ce dernier cas, la maladie moléculaire est dominée par la transmission familiale d'une anomalie du gène contrôlant la synthèse de l'hémoglobine. Dans le myélome au contraire, la perturbation du mécanisme de synthèse semble acquise et son déterminisme nous est encore totalement inconnu.

Quoiqu'il en soit, il faut aborder maintenant une donnée capitale qui permet, à l'heure actuelle, avec l'électrophorèse et l'ultracentrifugation, de connaître mieux la dysprotéinémie myélomateuse tant sur le plan théorique que sur le plan de la recherche et du diagnostic : ce sont les problèmes immunologiques.

C) ASPECTS IMMUNOLOGIQUES

Les études physiques et chimiques des protéines sériques myélomateuses fournissent assez peu de renseignements sur les rapports qu'elles contractent entre elles ou surtout avec les globulines normales. Les méthodes d'analyse immunologique constituent au contraire par leur spécificité un outil de choix pour la connaissance des protéines du myélome.

Nous distinguerons :

— les techniques immunologiques pures ;

— les techniques d'électrophorèse avec révélation immunologique ou immunoélectrophorèse de Grabar et Williams.

1) Résultats classiques.

Dès 1905, la grande spécificité des réactions immunochimiques fut appliquée aux perturbations sériques du myélome multiple.

Abderhalden et Rostoski recherchèrent en effet, grâce à un immunsérum antiprotéines urinaires myélomateuses, la présence de la protéine de Bence-Jones dans le sérum. La positivité de la réaction, aussi bien chez les myélomateux que chez les sujets normaux, leur fit affirmer l'existence de la protéine urinaire dans le sérum normal. Il semble aujourd'hui, que les protéines urinaires utilisées pour préparer l'antisérum, aient été multiples, associant à côté de la protéine de B. J. de nombreuses autres protéines plasmatiques, l'albumine en particulier.

Cependant, les mêmes expériences reprises quelques années plus tard par Massini (220), puis Baynes-Jones et Wilson (20) avec des immunsérums antiprotéines de B.-J., permirent de constater que ces antisérums réagissaient bien avec le sérum des malades même après épuisement par du sérum normal et que la protéine de B.-J. paraissait bien exister dans le sang du sujet myélomateux. Hektoen et Welker (159) trouvèrent que ces protéines urinaires avaient au moins deux types antigéniques.

Parallèlement se développèrent des travaux avec des antisérums dirigés contre les protéines sériques du myélome. Dans les techniques de diffusion en milieu gélifié de Oudin (260) (261), l'anticorps précipitant est incorporé à de la gélose dans un tube, et l'antigène en solution, placé au-dessus, diffuse dans le gel contenant l'anticorps. Le précipité spécifique antigène-anticorps progresse dans le tube et finit par s'immobiliser ; il se forme autant de fronts de précipitation qu'il y d'antigènes, lorsque le système est complexe.

Dans la technique d'Ouchterlony (259) antigènes et anticorps sont contenus chacun dans un trou creusé dans le gel coulé dans une boîte de Pétri. Ils diffusent l'un vers l'autre et forment, pour un système complexe, autant de précipités linéaires parallèles qu'il y a d'antigènes.

Cela permet la comparaison du comportement de deux ou plusieurs antigènes vis-à-vis d'un même immunsérum polyvalent, et d'observer ainsi :

— des réactions d'identité : trait de précipitation continue ;

— des différences : traits croisés ;

— enfin des identités partielles : ligne de précipitation bifurquée.

Wuhrmann et coll. (286) constatèrent ansi, en 1949, que des paraprotéines de mobilité rapide ne précipitaient pas au contact d'antisérums dirigés contre les γ-globulines normales, alors que les paraprotéines de mobilité lente, γ, réagissaient au contraire fort bien.

Wuhrmann, Wunderly et Hassig (387) étudièrent dix cas de myélome et immunisèrent des lapins avec les dix paraprotéines différentes, puis épuisèrent les antisérums obtenus avec du sérum humain normal. Ils constatèrent alors que quatre de ces antisérums précipitaient encore leur paraprotéine correspondante, qui était toujours, dans ces quatre cas, une protéine de mobilité β.

Ces quatre antisérums, comme les six autres, ne réagissaient ni avec le sérum normal ni avec les autres paraprotéines.

Kunkel, Slater et Good (112) étudièrent les courbes de précipitation quantitative de γ-globulines normales et de paraprotéines myélomateuses opposées à des immunsérums anti-γ-globulines normales ; ils observèrent que les paraprotéines réagissaient beaucoup plus faiblement que les γ normales et parfois même ne donnaient aucune précipitation lorsqu'elles avaient une mobilité β.

De même des antisérums dirigés contre les paraprotéines réagissaient beaucoup mieux avec celles-ci qu'avec les γ normales.

Ceci leur permit de conclure que les paraprotéines étaient des γ-globulines modifiées. Cependant elles conservaient une identité antigénique partielle avec les globulines normales comme le montrèrent les travaux de Lohss, Weiler et Hillmann, ceux de Wunderly, Gloor et Hassig (389) et de Deutsch (79).

Cette parenté immunochimique des protéines myélomateuses avec les γ-globulines normales, permit à Slater, Ward et Kun-

KEL (342) de proposer une classification des paraprotéines myélomateuses :

1. Celles qui étaient immunologiquement proches des γ-globulines normales et le plus souvent de mobilité lente.

2. Celles présentant une parenté antigénique faible ou nulle avec les γ normales et ayant une mobilité électrophorétique rapide.

L'année suivante, KORNGOLD et LIPARI (189) classèrent les protéines du myélome en trois groupes :

— Le groupe I renferme des protéines de mobilité variable, mais dont la constitution antigénique est voisine de celle des γ-globulines normales. La seule différence est l'absence de déterminants physiologiques, remplacés par d'autres, anormaux.

— Le groupe II est voisin du précédent, mais d'autres déterminants manquent. La mobilité électrophorétique est ici encore variable. — Le groupe III se compose uniquement des paraprotéines de mobilité β. Elles ne renferment qu'un petit nombre de déterminants antigéniques des γ normales et présentent en outre de nombreux déterminants propres, étrangers aux γ-globulines.

On peut déjà individualiser dans ce groupe III ce que HEREMANS (162) appellera les β_{2a}-paraprotéines.

Les résultats sont donc, on le voit, déjà intéressants mais un progrès très important va être fait lors de l'apparition des techniques immunoélectrophorétiques.

2) Les données de l'immunoélectrophorèse.

1° *Historique.*

GRABAR et WILLIAMS (137) eurent l'idée de combiner l'électrophorèse en milieu gélifié et la technique de diffusion en gel d'OUCHTERLONY.

Cette analyse immunoélectrophorétique permet donc, en une seule fois, une double identification des protéines puisqu'à la première séparation par les mobilités électrophorétiques, s'ajoute la précipitation immunochimique au moyen d'anticorps, groupés le plus souvent en un immunsérum poylvalent dirigé contre le sérum humain normal.

Les techniques initiales ont été modifiées, en particulier par SCHEIDEGGER (318) qui utilise une microméthode sur lame de microscope.

L'application de cette méthode aux sérums de myélome multiple fut véritablement introduite, en 1955, par WILLIAMS et GRABAR (382) qui notèrent une ligne de précipitation anormale de la γ-globuline.

Une étude complète de 30 sérums de myélome parut en 1956. GRABAR, FAUVERT, BURTIN et HARTMANN (139) utilisèrent un immunsérum polyvalent et un immunsérum anti-γ-globulines.

Les anomalies les plus évidentes portent sur le trait de précipitation des γ-globulines :

a) Tantôt à l'emplacement électrophorétique de la protéine homogène et anormale du myélome, existe un brusque épaississement avançant vers la gouttière des anticorps, du fait de l'excès d'antigène en cette zone, alors que les autres segments de la ligne des γ-globulines, correspondant aux globulines normales sont très peu nets, voire même absents.

La localisation électrophorétique de cette précipitation anormale est très variable ; elle se produit quelquefois en zone β mais elle disparaît toujours après épuisement de l'immunsérum avec des γ-globulines purifiées.

b) Tantôt il existe un trait de précipitation supplémentaire, de mobilité assez rapide et se raccordant partiellement au trait principal, comme s'il existait entre eux une réaction d'identité partielle. Grâce à des épuisements appropriés avec des protéines urinaires de B.-J., les auteurs purent démontrer qu'il s'agissait de protéines de B.-J. sériques.

Les traits de précipitation peuvent apparaître dans le sérum de malades n'ayant apparemment aucune protéinémie pathologique.

c) Un troisième groupe d'anomalies consistait en un croisement des traits de précipitation des γ rapides et des γ lentes. L'épuisement par des γ-globulines normales confirmait bien cependant l'appartenance des deux protéines à ce groupe, l'une et l'autre possédant certains des déterminants antigéniques des globulines γ, mais non tous.

Grabar, Fauvert et coll. (139) décrivirent de plus des anomalies de la β_{2a}-globuline, avec un trait fortement diminué, intensifié ou anormalement curviligne.

Ils envisagèrent également le rapport entre le type électrophorétique et l'image immunologique : sur 12 γ-myélomes, dix présentaient une image épaissie caractéristique ; sur dix β-myélomes, la partie rapide du trait γ était épaissie cinq fois. La β_{2a}-globuline était six fois réduite ou absente et quatre fois anormalement accrue.

Les résultats de ce travail fondamental ont ensuite été confirmés par divers auteurs. Scheidegger (320), Martin et Scheidegger (216), Scheidegger et Buzzi (322) précisèrent quelques-uns des déterminants antigéniques absents des paraprotéines myélomateuses grâce à l'absorption de divers immunsérums par des protéines de B.-J.

Enfin Heremans (161) caractérisa les perturbations possibles de la β_{2a}-globuline dans le myélome, précisa ses rapports avec certaines paraprotéines rapides et proposa le terme de « β_{2a}-myélome ».

2° *Diagnostic immunoélectrophorétique des perturbations sériques myélomateuses.*

Les divers auteurs ayant utilisé l'immunoélectrophorèse pour le diagnostic et l'étude immunochimique des myélomes se sont généralement servis de trois espèces d'immunsérums :

— des antisérums polyvalents épuisés par une préparation de γ-globulines pures ;

— des immunsérums spécifiquement dirigés contre la globuline β_{2a} et contre la β_2-macroglobuline, ce dernier cas destiné à exclure les macroglobulinémies.

En fait on peut, avec Heremans (162), analyser un sérum myélomateux grâce aux divers antisérums suivants :

— antisérum polyvalent,

— anti-sérum polyvalent épuisé par les γ-globulines ;

— antisérum polyvalent épuisé par la β_{2a}-globuline ;

— antisérum polyvalent épuisé par la β_2-macroglobuline ;

— immunsérum spécifique anti-γ ;

— immunsérum spécifique anti-β_{2a} ;

— immunsérum spécifique anti-β_{2m}.

Il est possible également de préparer des immunsérums spécifiques pour chaque sang de myélome par immunisation de lapins et d'obtenir la précipitation isolée et spécifique de la paraprotéine, après épuisement de l'antisérum obtenu par du sérum humain normal : Gomès da Costa et coll. (134) (135).

On peut ainsi envisager les *anomalies morphologiques du tracé.*

a) L'image de la paraprotéine.

Qu'elle soit abondante ou discrète, la paraprotéine représente toujours une accumulation locale d'antigène dont l'image est un trait de précipitation épais, resserré et convexe, bombant vers la gouttière des anticorps et ne s'étendant que sur une courte distance.

Cet excès d'antigène est parfois tel que le précipité paraprotéique se redissout totalement ou en partie au cours de la diffusion ; il faut alors diluer le sérum en proportion convenable pour faire apparaître facilement l'arc paraprotéique.

Le trait de précipitation paraprotéique peut-être observé :

— soit au milieu de la ligne de précipitation d'une protéine aisément reconnaissable, le plus souvent la ligne γ ; dès lors la nature immunochimique de la substance anormale est évidente ;

— soit en dehors d'une ligne normale, sous forme d'une ligne supplémentaire ; celle-ci est le plus souvent raccordée à la ligne γ par l'une des extrémités, ce qui indique une parenté antigénique au moins partielle avec la γ-globuline.

Enfin, des paraprotéines doubles ou multiples peuvent s'observer, donnant alors un trait de précipitation ondulé.

b) Les anomalies accessoires. Il peut s'agir :

1. De lignes supplémentaires raccordées au trait gamma ou apparemment libres qui généralement disparaissent après épuisement de l'antisérum par les γ-globulines ; une ligne supplémentaire s'observe tout particulièrement chez les sujets ayant une forte

protéinémie de B.-J. et elle disparaît d'ailleurs après épuisement de l'antisérum par la protéine urinaire, alors que les γ-globulines restent sans modification.

On observe parfois plusieurs lignes supplémentaires rejoignant la ligne γ sans la croiser, dénotant ainsi la complexité des anomalies protéiques de certains sérums myélomateux.

2. D'anomalies qualitatives mineures des lignes normales, tel que le dédoublement de la ligne gamma, ce qui ne s'observe jamais avec les γ-globulines normales quel que soit l'immunsérum employé.

3. D'anomalies quantitatives des protéines normales du système gamma, c'est-à-dire des protéines n'intervenant pas dans la transformation paraprotéique.

Ainsi, dans les γ-myélomes, il est fréquent d'observer un affaiblissement, voire même une disparition complète de l'arc de la β_{2a}-globuline. De même les segments du trait gamma se trouvant de part et d'autres de la précipitation paraprotéique et correspondant à ce qui reste des γ-globulines normales, sont très souvent atténués. Il suffit, pour objectiver ce fait, d'enrichir un sérum myélomateux en gamma globulines marquées par l'^{131}I et de repérer ensuite sur les lames, par autoradiographie, l'emplacement des γ-globulines normales ; celles-ci sont alors fortement diminuées.

Ces anomalies, quoique mineures, restent importantes surtout dans les cas où l'image classique est absente, car elles doivent permettre alors de faire le diagnostic.

En effet, l'immunoélectrophorèse ne connaît pratiquement pas de myélomes à spectre protéique entièrement normal (Heremans) (162).

3° *Classification immunochimique des myélomes.*

Diverses classifications ont été proposées, comme nous l'avons vu, ainsi celle de Korngold et Lipari (189) ou celle de Putnam (302), mais l'immunoélectrophorèse a permis de préciser certains points et nous pouvons ainsi distinguer avec Heremans (162), selon la constitution antigénique, 3 classes de paraprotéines :

— celles dérivant exclusivement de l'antigène gamma,

— celles contenant surtout l'antigène β_{2a} et également des déterminants gamma,

— celles constitutées exclusivement de déterminants de type Bence-Jones.

A. — Les paraprotéines dérivées exclusivement de l'antigène γ

L'arc de précipitation de ces paraprotéines s'inscrit dans le trajet de la ligne des γ-globulines, prouvant aisément leur nature antigénique.

L'étude de leur constitution antigénique est difficile. Les résultats immunologiques d'hydrolyse papaïnique ont permis, comme nous le verrons, de préciser leur mosaïque antigénique et de dénoter *le caractère incomplet de celle-ci.*

Il ne semble pas, en tout cas, que ces paraprotéines gamma existent dans le métabolisme normal, même à l'état de traces.

— Sur le plan descriptif, ces paraprotéines de type exclusivement gamma correspondent aux classes I et II de KORNGOLD. Elles forment le groupe le plus important : 72 % selon HEREMANS (162), 50 % selon FINE et CREYSSEL (116). Selon ces derniers auteurs, il y a également une relation entre la constitution antigénique et la mobilité électrophorétique puisque ces paraprotéines de type γ ont toujours une mobilité inférieure à 1,8 $cm^2/V^{-1}/S^{-1}/10^{-5}$.

B. — PARAPROTÉINES A ANTIGÈNES β_{2a}.

Correspondant au groupe III de KORNGOLD et caractérisées sur le tracé immunoélectrophorétique par la persistance de leur arc de précipitation après épuisement de l'immunsérum par des γ-globulines, ces paraprotéines ont été particulièrement bien étudiées par HEREMANS. Déjà GRABAR en 1956, signalait une forte précipitation d'une ligne β_{2a} dans certains myélomes.

Souvent il persiste des déterminants antigéniques γ associés à ceux de la β_{2a} et il y a d'ailleurs une grande variabilité dans les proportions des deux catégories de déterminants, les β_{2a} dominant cependant dans ce groupe.

L'identification de ces paraprotéines est facile lorsque l'antisérum employé est riche en anticorps anti β_{2a}-globulines, ce qui a permis à HEREMANS de relever dans sa statistique un pourcentage de 23 %, alors que FAUVERT et coll. (109) en dénombrent 13,5 % et FINE et CREYSSEL (116), 30 %.

Ces derniers auteurs ont constaté de plus qu'il existait encore un rapport avec la mobilité électrophorétique, les paraprotéines β_{2a} ayant le plus souvent une mobilité supérieure à 2,6, mobilité correspondant parfois à des myélomes α_2.

C. — PARAPROTÉINES DE TYPE BENCE-JONES.

Parfois, le tracé immunoélectrophorétique se révèle normal, en dehors d'une ligne très fine se rattachant au trait γ et ceci plus particulièrement lorsqu'il n'y a pas, en électrophorèse sur papier, de grosse quantité de paraprotéine dans le sérum.

La ligne anormale a, du fait de la jonction avec l'arc γ, une réaction d'identité partielle avec les gamma globulines, c'est-à-dire des déterminants communs avec celles-ci. D'ailleurs l'absorption de l'immunsérum par des γ-globulines fait disparaître la ligne anormale.

De même, il a été constaté que cette protéine anormale ne contenait aucun déterminant spécifique β_{2a}. Pourtant l'absorption de l'immunsérum par la β_{2a} fait disparaître son arc de précipitation.

Il faut donc admettre que la paraprotéine est constituée exclusivement de déterminants communs aux deux globulines et qu'elle ne possède aucun déterminant spécifique γ ou β_{2a}.

L'existence de paraprotéines sériques de ce type est démontrée :

— tantôt par l'ultracentrifugation du sérum, après isolement électrophorétique préalable de la fraction anormale (HEREMANS) (162) ;

— tantôt par l'immunoélectrophorèse d'un mélange de sérum et de protéine urinaire.

D'ailleurs, selon Fauvert, Hartmann, Mallarmé et Boivin (109), la présence d'une protéine de B.-J. sérique est retrouvée à l'immunoélectrophorèse dans 52 % des cas, sous la forme d'un trait supplémentaire qui, selon sa vitesse de migration, se raccorde du côté cathodique ou anodique à la ligne des gamma-globulines, ou lui reste parallèle et sous-jacent.

L'existence de ces paraprotéines de type B.-J. semble par ailleurs corroborée par la notion de « pyroglobulines ».

En effet, Collier, Reich et King (58) découvrirent, à l'occasion d'examens sérologiques de routine pour dépistage de la syphilis, quatre sérums précipitant par chauffage à 56°C pendant trente minutes. Ces sérums provenaient de malades atteints de myélome multiple.

Depuis, de nouveaux cas ont été signalés : Martin et Mathieson (218) (219), qui proposèrent le terme de pyroglobulines pour désigner cette aptitude d'une protéine sérique à coaguler par la chaleur vers 50-60° C, Brachfeld et Myerson (40), Huisman et coll. (173) et Fine, Dormont et coll. (117).

Le caractère de thermocoagulabilité aux environs de 60° C est donc tentant pour les identifier aux protéines de B.-J. ; d'autant que, en dehors de ces cas de pyroglobulinémie, les paraprotéines sériques de type B.-J. ne sont identifiées que par l'ultracentrifugation ou par l'immunoélectrophorèse.

Dans le cas de Huisman, la composition en acides aminés de la pyroglobuline l'éloignerait des protéines de B.-J., par la richesse relative en méthionine. Dans le cas de Fine et coll. au contraire, de nombreux éléments plaident en faveur d'une certaine similitude entre pyroglobuline sérique et protéine urinaire principale :

thermocoagulabilité identique,
faible constante de sédimentation de la pyroglobuline (3,95),
comportement identique en électrophorèse sur gel d'amidon.

Il semble donc possible que ces pyroglobulines soient assimilables aux paraprotéines de type B.-J., tout au moins par leur poids moléculaire.

De plus, la thermocoagulabilité ne paraît être qu'un caractère physicochimique particulier disparaissant, comme la précipitation des cryoglobulines, après action d'agents réducteurs (Fine et coll.) (117).

3) **Propriétés immunologiques et hydrolyse enzymatique.**

a) *Gamma-globulines normales.*

Les premières expériences portant sur l'étude immunologique de fragments protéiques résultant d'hydrolyses enzymatiques, sont consacrées aux gamma-globulines normales.

Ainsi Porter, reprenant un travail plus ancien de Petermann (272) hydrolysa par la papaïne une γ-globuline de lapin anti-

ovalbumine et obtint des fragments ayant conservé partiellement l'activité immunologique. Ce même auteur (284) (285) parvint ensuite, par chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose, à isoler dans l'hydrolysat trois fragments principaux :

— Le fragment III est identique pour toutes les γ-globulines. Il est responsable de la spécificité antigénique commune des γ-globulines.

— Les deux autres parties (fragments I et II) contiennent vraisemblablement les anticorps et sont aussi responsables de l'hétérogénéité physique des γ-globulines puisque ces fragments, assez sensiblement identiques entre eux (Gitlin et Merler) (130), varient d'une molécule à l'autre.

L'analyse immunoélectrophorétique de γ-globulines purifiées soumises à l'action de la papaïne, fut pratiquée par Heremans (162) et Edelman (94). La plupart des antisérums utilisés révélèrent deux lignes principales : l'une étirée, de mobilité lente, l'autre plus rapide, de mobilité β_2.

La papaïne libère donc des fragments porteurs de divers déterminants antigéniques. Cependant, il semble que le constituant lent est qualitativement différent selon la mobilité de la globuline γ envisagée (ce qui fut démontré par l'emploi de sous fractions plus ou moins rapides de γ-globulines obtenues par électrophorèse en gel d'amidon), alors que le constituant rapide paraît au contraire identique pour toutes les γ-globulines.

L'étude électrophorétique et immunologique de ces deux constituants a pu être pratiquée après leur isolement par chromatographie sur DEAE-cellulose.

Les différences de mobilité électrophorétique du fragment lent, par rapport à la molécule γ non attaquée, suggèrent que les chaînes d'amino-acides responsables de la structure antigénique diffèrent de celles dont dépend la mobilité électrique.

De plus, l'obtention en immunoélectrophorèse de plusieurs arcs de précipitation après hydrolyse, suggère deux hypothèses :

— soit présence de déterminants antigéniques multiples et différents sur chaque molécule γ ;

— soit présence de certains groupes de molécules ayant chacun des déterminants simples mais différents de ceux des molécules voisines.

Les résultats obtenus avec les protéines myélomateuses plaident, comme nous allons le voir, en faveur du modèle à déterminants multiples.

Quant aux hydrolyses par d'autres ferments protéolytiques, elles n'ont guère été jusqu'ici envisagées.

Signalons simplement les travaux de Nisonoff (245) avec la pepsine qui entraîne une perte du pouvoir anticorps de 65 à 70 % et aboutit à un composé de constante de sédimentation 5 S, et ceux de Schultze et Schwick (329) avec la trypsine et la chymotrypsine sur le sérum entier.

b) *Globulines myélomateuses.*

Les globulines pathologiques rencontrées dans le myélome sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse papaïnique, donnant deux ou plusieurs constituants de constante de sédimentation 3,3 à 3,5 S et de poids moléculaire 35 à 40 000.

Stiehm, Morton et Deutsch (358), étudiant les réactions de précipitation quantitative en tube de protéines myélomateuses, de protéines de B.-J. et d'hydrolysats papaïniques avec des antisérums antiprotéines myélomateuses et anti-B.-J., observèrent les résultats suivants :

— Il existe d'abord, ce que nous retrouverons, des réactions croisées entre les protéines myélomateuses et les anticorps B.-J. et inversement entre les protéines de B.-J. et les anticorps anti-protéines sériques.

— L'hydrolysat papaïnique total réagit avec les deux anticorps, mais à un degré moindre que les protéines sériques non digérées.

— Les fractions isolées d'hydrolysat de protéines sériques réagissent mieux avec les anticorps B.-J. correspondant qu'avec les anticorps-protéines sériques myélomateuses ; les deux fractions produites par la papaïne sont d'ailleurs immunologiquement distinctes.

— Il semble donc que la papaïne divise les déterminants antigéniques en une fraction spécifique vis-à-vis des anticorps antiglobulines sériques correspondants et une autre fraction responsable de la réactivité croisée avec les anticorps anti-B.-J. homologues. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de Porter (285) pour les globulines immunes de lapin.

Stiehm et coll. (358) discutent ces données immunologiques, en les comparant au fait que l'hydrolyse papaïnique conduit à des produits dont la taille moléculaire et la constante de sédimentation sont celles des protéines de B.-J. ; dès lors se pose le problème de l'identité d'un des fragments de l'hydrolysat papaïnique avec la protéine urinaire d'une part, et avec les sous-unités de γ-globulines obtenues par réduction d'autre part.

Heremans (162) a pu caractériser par hydrolyse papaïnique le caractère incomplet de la mosaïque antigénique des paraprotéines γ.

Pour ce faire sont envisagées :

— une analyse directe par comparaison des produits d'hydrolyse avec les fragments fournis par une γ-globuline normale hydrolysée dans les mêmes conditions ;

— une analyse indirecte où la paraprotéine non hydrolysée est révélée au moyen d'un antisérum épuisé spécifiquement par l'un ou l'autre des principaux fragments d'hydrolyse de la molécule gamma normale.

Ainsi dans les paraprotéines de type γ, correspondant au groupe I de Korngold (189), les déterminants antigéniques correspondant aux deux fragments lent (L) et rapide (R) sont bien représentés sur

la paraprotéine et la scission papaïnique donne d'ailleurs bien les deux constituants (L) et (R).

Dans les paraprotéines du groupe II au contraire, les déterminants de type font défaut (L) et l'hydrolyse ne donne pas naissance à un constituant lent en électrophorèse.

Quant aux paraprotéines de type β_{2a}, correspondant au groupe III de Korngold, l'hydrolyse papaïnique et l'étude des épuisements par les fractions (R) et (L), ont permis de montrer que les déterminants γ qu'elles possèdent appartiennent exclusivement au fragment (L). En effet, l'épuisement d'un antisérum révélant les déterminants γ de ces paraprotéines par le constituant (R), n'affecte pas la ligne de précipitation immunoélectrophorétique, alors que l'épuisement par (L) la fait totalement disparaître.

En résumé, les éléments fournis par l'immunoélectrophorèse sont très importants.

— Elle met bien en évidence le caractère anormal, l'antigénicité incomplète des paraprotéines.

— Elle a donc un intérêt majeur dans le diagnostic des formes cliniquement incomplètes (Ruffié et coll.) (313).

— Elle permet une classification immunochimique des myélomes plasmocytaires et complète les résultats de l'électrophorèse.

— Ses difficultés sont liées :

- soit au sérum du malade lui-même lorsque la paraprotéine est en excès ou en quantité trop faible, sa révélation étant alors plus difficile ;
- soit à la carence de certains immunsérums polyvalents, justifiant l'emploi de divers antisérums spécifiques.

La méthode immunoélectrophorétique reste néanmoins très précieuse et nous l'avons personnellement largement utilisée pour nos études d'hydrolyse enzymatique.

D) ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET NOSOLOGIQUES

1) Plasmocytes et globulines myélomateuses.

On admet, classiquement, que le foie joue un rôle important dans la production des protéines plasmatiques. Cependant Miller et coll (224), en perfusant des foies de rat avec du sang enrichi en amino-acides marqués par ^{14}C ont montré que toutes les protéines plasmatiques étaient marquées, sauf les γ-globulines. D'ailleurs, dès le début du XX^{e} siècle déjà, la possibilité d'une activité sécrétoire des plasmocytes et de leur intervention dans certains processus immunitaires avait été envisagée par Hübschman, par Hoffman et par Metchnikoff.

Le plasmocyte, individualisé par Waldeyer, par Unna, par Marschako et divers autres auteurs, est un élément libre, peu mobile, qui participe à la constitution des tissus myéloïde et lymphoïde, où il représente 1 à 2 % des éléments hématopoïétiques.

Les plasmocytes proviendraient des éléments réticulaires de la moelle osseuse. Schreten a trouvé en effet dans la moelle osseuse normale et dans certaines agranulocytoses, des formes de passage entre éléments réticulaires et plasmocytes ; certains vont même jusqu'à classer les myélomes dans les tumeurs du système réticulo-endothélial.

Une somme considérable d'arguments est maintenant réunie en faveur de la biosynthèse et de la sécrétion des γ-globulines par les plasmocytes.

a) *Faits histologiques.*

Sans aborder le problème histologique du plasmocyte, notons simplement que les caractères cytologiques et cytochimiques de ces cellules évoquent une grande activité fonctionnelle.

La richesse du cytoplasme en acides ribonucléiques, dont on connaît le rôle dans la biosynthèse des protéines, leur persistance au cours de la maturation cellulaire, la présence possible de corps de Russel et de cristaux protéiques, l'importance du corps de Golgi, la présence d'un ergastoplasme, sont autant de signes morphologiques en faveur d'une activité sécrétoire.

Sur le plan dynamique comme l'a bien montré la microcinématographie au microscope en contraste de phase de Thiéry, les divers stades semblent être les suivants :

— absorption par pinocytose ;

— élaboration par l'intermédiaire plus spécialement du corps de Golgi et de l'ergastoplasme ;

— excrétion par ouverture dans le milieu ambiant des vacuoles intracytoplasmiques, résultant du gonflement des sacs ergastoplasmiques (Kempf) (186).

b) *Faits cliniques.*

L'unité cellulaire, plasmocytaire, de diverses tumeurs osseuses, multiples ou solitaires, fut envisagée pour la première fois par Wright en 1900, et reprise par Walgren ; puis la quasi exclusivité du type cellulaire plasmocytaire fut vérifiée par la pratique de la ponction sternale introduite par Arinkin.

Ainsi purent être retenues diverses associations de plasmocytose médullaire ou viscérale et d'hyperglobulinémie dont la fréquence avait déjà été soulignée en 1937 par Bing et Plum qui admettaient, dès cette date, l'intervention des plasmocytes dans la synthèse des globulines du plasma.

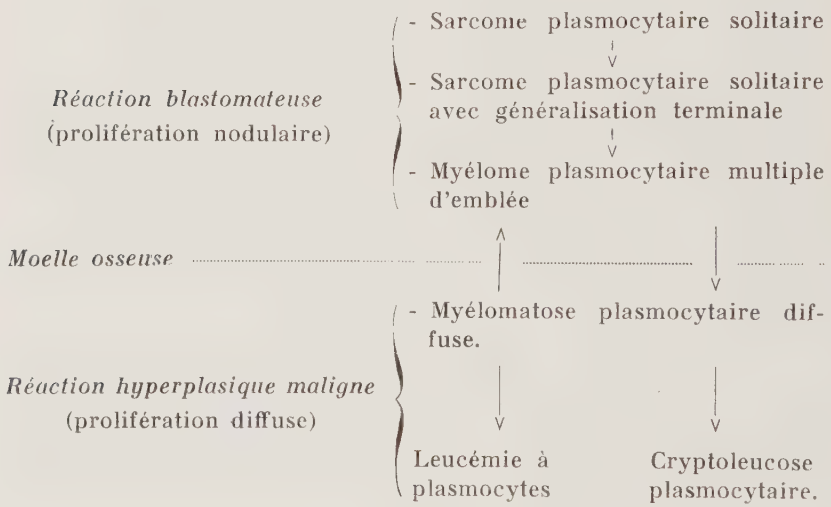
Cependant, les observations où la plasmocytose était importante, se rapportaient à des affections très diverses : cirrhose de Laênnec, maladie de Nicolas-Favre, kalaazar, infections chroniques, réactions d'intolérance ou d'anaphylaxie (accidents sériques, ou intoxications médicamenteuses), voire même agranulocytose.

De plus, l'hyperglobulinémie n'y était pas la règle.

Inversement, de nombreuses hyperglobulinémies, comme par exemple celle du kalaazar, ne s'accompagnent pas toujours de plasmocytose médullaire.

Par contre, dans diverses autres manifestations cliniques, toujours plasmocytaires sur le plan histologique et telles que le plasmocytome solitaire des os ou le plasmocytome extra-osseux, la myélomatose diffuse et la leucose à plasmocytes, l'augmentation des globulines sériques est habituelle (Diguglielmo) (87).

Les interrelations entre ces diverses hémopathies à plasmocytes ont été bien mises en évidence par Fruhling et Chadli (126), comme le montre le schéma :



c) *Faits expérimentaux*

La plupart des faits expérimentaux visant à étudier l'association hyperglobulinémie et prolifération plasmocytaire (ou réticulohistiocytaire), reposent sur les constatations faites après déclenchement de réactions immunitaires ou d'un processus d'hypersensibilisation.

Ainsi Kolouch a noté une plasmocytose médullaire chez le lapin sensibilisé au *streptocoque viridans* ; Braunsteiner, Zlotckis, Bjorneboe ont vu apparaître des plasmocytes dans la rate et les ganglions de lapins immunisés, alors même que les anticorps apparaissaient. Amano et Hanakoa (7) (8), provoquant chez le lapin une plasmocytose artificielle, ont montré la richesse de ces cellules en globulines.

Cependant ces diverses expérimentations, si elles permettent d'accepter l'idée de la sécrétion des anticorps par des cellules de

nature réticulaire en orientation plasmocytaire, ne donnent pas de renseignements spécifiques pour les protéines myélomateuses.

Il faut pour cela considérer :

— les arguments fournis par l'étude du myélome humain lui-même d'une part,

— les données expérimentales des cultures de tissu et des plasmocytomes expérimentaux d'autre part.

1° *L'origine plasmocytaire des globulines myélomateuses chez l'homme.*

Des faits très importants ont été apportés par l'étude comparative d'immunoélectrophorèses du sérum et de la moelle osseuse d'un même malade : Monnier et coll. (227), Serre et Jaffiol (339), Havez et Biserte (156). Ces derniers surtout, étudiant un β_{2a}-myélome, n'ont pas été gênés par la présence possible, dans la moelle, de γ-globulines normales.

La moelle sternale est préalablement lavée à plusieurs reprises pour éliminer toute trace de sang, puis les protéines cellulaires sont libérées par éclatement en milieu franchement hypotonique.

L'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse révèlent alors la présence d'une protéine anormale exactement identique, quant à sa mobilité, à la paraprotéine sérique.

Ces résultats confirment dont la présence dans les plasmocytes d'une globuline anormale ; ils ne permettent cependant pas d'affirmer à coup sûr, que la synthèse s'y effectue vraiment « in situ ».

Ainsi Soons et Westenbrink (350), reprenant les idées avancées par Brass et par Waldenstrôm (372), ont montré que des suspensions de molle osseuse incubées dans un milieu contenant une globuline anormale, faisaient diminuer le taux de celle-ci. Par contre, des coupes de foie provenant de malades myélomateux en contact avec le sérum riche en paraprotéine, provoquent une forte augmentation du taux de cette dernière. De même Neufeld (239), incubant le plasma d'un myélomateux avec sa propre moelle osseuse, a observé une diminution du taux paraprotéique à l'électrophorèse alors que l'incubation avec des coupes de foie du même malade entraînait une augmentation.

Dès lors, ces auteurs considèrent le foie comme étant l'organe de synthèse, les plasmocytes absorbant seulement la globuline anormale et devenant pathologiques dans un deuxième temps.

Cependant, Sonnet, Gillant et Sokal (349), mettant en contact les cellules pathologiques d'une leucose plasmocytaire avec du glucose marqué au ^{14}C, ont vu apparaître, dans le milieu, des paraprotéines marquées. Truax et coll. (365) ont utilisé, pour des expériences similaires, de la DL-leucine marquée au tritium.

Le problème reste donc difficile à résoudre. Mais un autre argument, également solide, est celui donné par l'étude des plasmocytomes expérimentaux de la souris.

2° *Les cultures de tissu et les plasmocytomes expérimentaux de la souris.*

— *Les cultures de plasmocytes* ont permis de mettre en évidence l'apparition d'anticorps ou de globulines dans le milieu de culture (Amano), (Fagreus) (100). Ce dernier, en utilisant la pulpe splénique, a observé que la production d'anticorps était d'autant plus élevée que cette pulpe était plus riche en plasmocytes.

— *Les plasmocytomes expérimentaux de la souris,* réalisant des tumeurs abdominales transmissibles par greffe ou injection, sont de connaissance assez récente : Rasknielsen et Gormsen, 1951, Dunn, 1957. Potter, Fahey et Pilgrim (287) ont montré que certaines de ces tumeurs (tumeur 5563) entraînaient des lésions ostéolytiques et des perturbations protéiques sériques du type hyperglobulinémique. Leur étude s'est depuis considérablement élargie sous l'impulsion, en particulier, de Fahey et de son école.

Cet auteur observa (104) qu'une nouvelle souche tumorale (5647) déterminait une dysprotéinémie ressemblant à celle du myélome humain avec élévation des γ-globulines ou des β_{2a}-globulines.

Askonas et Fahey (14), Humphrey et Fahey (174) démontrèrent bientôt dans les urines de souris ayant le myélome « MPC-2 », la présence d'une protéine de type B.-J. dont la mobilité β était identique à celle de la protéine sérique. Chacune de ces protéines isolée et purifiée par chromatographie sur résine échangeuse d'ions (DEAE-cellulose) a été bien caractérisée.

Ces auteurs, étudiant *in vitro* la biosynthèse de ces protéines par incubation de coupes de tissu tumoral avec des acides aminés marqués, ont pu suivre l'incorporation des molécules traceuses dans les protéines sériques et urinaires isolées par chromatographie ou par précipitation contre des antisérums spécifiques.

Ils ont observé :

— que les cellules plasmocytaires forment bien les deux protéines, mais qu'aucune des deux n'est le précurseur ou le produit de scission de l'autre, ce qui, comme nous le verrons, est en accord avec les travaux de Putnam et Hardy (295) et Putnam et Miyake (302) ;

— que, par ailleurs, le métabolisme des globulines γ et de l'albumine, observé par marquage à $I^{131}I$, est très diminué au profit de l'accélération métabolique myélomateuse : la synthèse de la protéine sérique atteint un taux considérable : 1,5 à 2 mg par g de tissu frais et par jour (Askonas) (15).

En électrophorèse en gel d'amidon, il s'agit de globulines hétérogènes, donnant 5 bandes définies dont certains composants, séparés en partie par chromatographie sur DEAE-cellulose, ont les mêmes groupements antigéniques et la même constante de sédimentation en ultracentrifugation : 6,5 S (Askonas et Fahey) (13).

L'hydrolyse par la papaïne de ces protéines myélomateuses conduit à 2 fragments, l'un rapide, l'autre lent en électrophorèse ; les aspects immunoélectrophorétiques sont très superposables à ceux obtenus par clivage de γ-globulines myélomateuses humaines ou de γ-globulines normales (Askonas et Fahey) (13) (Fahey et Askonas) (105).

Bien que certaines souches (70429) de plasmocytomes ne provoquent pas de modification protidique, que certaines entraînent surtout des modifications leucémiques du sang périphérique (souche 36), on voit donc la très grande parenté biochimique entre ces plasmocytomes expérimentaux et la maladie humaine. C'est un argument décisif en faveur de l'origine plasmocytaire de la perturbation du myélome.

2) **Les rapports entre la dysglobulinémie du myélome et les autres dysglobulinémies malignes.**

a) *La maladie de Waldenstrôm.*

C'est une affection primitive caractérisée :

— *sur le plan clinique*, par une anémie associée à des altérations variables de l'appareil splénoganglionnaire, par la fréquence de manifestations hémorragiques et par son évolution lentement mortelle ;

— *sur le plan anatomo-pathologique*, par une infiltration réticulolymphoïde des organes hématopoïétiques ;

— *sur le plan biologique* enfin, par l'existence, en grande proportion, de globulines plasmatiques de poids moléculaire élevé, de constante de sédimentation supérieure à 11 S.

Parmi ces données, la fréquence de l'hypertrophie ganglionnaire et splénique, des hémorragies, la rareté des lésions osseuses au contraire, la présence en ultracentrifugation et en immunoélectrophorèse de macroglobulines du type β_{2m}, la lymphocytose avec hyperplasie des cellules réticulaires et un taux de plasmocytes le plus souvent normal sur le médullogramme, bref tous ces éléments contribuent à distinguer la maladie de Waldenstrôm du myélome multiple.

Cependant il existe :

— des éléments de rapprochement,

— des cas intermédiaires.

a - Les éléments de rapprochement.

Ils sont d'abord *étiologiques* par la survenue des deux affections chez le sujet âgé, avec une prédominance assez nette pour le sexe masculin.

Ils sont ensuite *cliniques* car splénomégalie et adénopathies peuvent se rencontrer dans le myélome alors que des lésions osseuses (ostéoporose, lacunes, fractures pathologiques) peuvent se voir dans la maladie de Waldenstrôm.

De même les lésions rénales, fréquentes et graves dans le myélome, ne sont pas exceptionnelles dans les macroglobulinémies, ainsi que les lésions du fond d'œil, souvent comparables dans les deux cas avec hémorragies, stase et dilatation veineuse.

Donc, en définitive, seuls sont valables pour différencier les deux affections :

— les *critères sanguins :* ultracentrifugation, électrophorèse en gel d'amidon et immunoélectrophorèse ;

—les *critères cytologiques* de la moelle sternale où plasmocytes et réticulo-lymphocytes s'opposent indiscutablement.

Cependant, des relations très étroites subsistent entre ces deux maladies métaboliques, objectivées de façon plus éclatante encore par les cas « frontière ».

β - *Les cas intermédiaires et atypiques.*

Bien qu'il s'agisse d'une éventualité rare, il existe certainement des myélomes avec macroglobulinémie. Adner, Wallenius et Werner (5) rapportent un cas de myélome cliniquement typique mais avec une macroglobulinémie (19 S) formant 47 % des protéines totales. Ces auteurs, faisant la revue des cas analogues publiés, parmi lesquels on peut citer ceux de : Grisolia et Cohen (143), Wunderly et Piller (390), Hörner (170), Creyssel et coll. (65), Kappeler, Gugler et Riva (184), proposent d'appeler la véritable maladie de Waldenstrôm : « réticulose » de Waldenstrôm puisque, selon eux, la macroglobulinémie peut être un symptôme courant.

D'autres fois, le myélome multiple s'accompagne encore de macroglobulinémie, mais dans de moindres proportions et ses constituants lourds ont une constante de sédimentation plus basse, Putnam et Udin (291). Enfin au cours de l'évolution d'une macroglobulinémie de Waldenstrôm peut apparaître une plasmocytose sanguine et médullaire alors qu'au contraire, certaines observations de maladie de Kahler comportent un accroissement plus ou moins important de lymphocytes dans la moelle osseuse.

De toute façon, en dehors des aspects histologiques, quelquefois très proches dans l'une et l'autre affection dont le processus élémentaire, réticulaire, est le même, toutes les transitions sont possibles sur le plan humoral. Il faut des critères d'examen précis tels qu'ultracentrifugation, électrophorèse en gel d'amidon ou immunoélectrophorèse, pour orienter dans certains cas le diagnostic vers le myélome ou la macroglobulinémie.

b) *Les dysglobulinémies des hémopathies.*

Les altérations électrophorétiques dans les hémopathies sont très fréquentes et ont été étudiées par de nombreux auteurs parmi lesquels on peut citer en France : Croizat et Creyssel (71), Seligmann (333) (336), Vieux (368), Olmer et Mongin (248) (249), Fine et coll. (113).

— Ainsi, au cours des leucoses aiguës, des pics d'hypergammaglobulinémies avec globulinurie peuvent s'observer simulant cliniquement le plasmocytome multiple.

La frontière entre ces leucoses et la leucose à plasmocytes est d'ailleurs peu nette et bien que les tableaux biologiques puissent ressembler à ceux de la maladie de Kahler, l'immunoélectrophorèse cependant, n'objective que des anomalies mineures.

— Dans les leucoses chroniques, la cytologie et la dysprotéinémie de la leucose lymphoïde se rapprochent davantage de celles de

la maladie de Waldenstrôm que de celles du myélome. Elles réalisent même parfois un tableau de macroglobulinémie véritable dite alors macroglobulinémie symptomatique (Braunsteiner et Sailer) (41).

— Dans les sarcomes des organes hématopoïétiques, les dysprotéinémies sont fréquentes, revêtant le type macroglobulinémique ou myélomateux, surtout dans les lymphosarcomes, Creyssel et coll. (66), Fine et coll. (113), où l'on a pu constater une ostéolyse, une protéinurie de B.-J. associées aux perturbations sériques pseudo-myélomateuses.

— Enfin la constatation possible de macroglobulines dans le sérum de malades atteints de cancers épithéliaux variés (utérus, bronches, estomac, etc...) amène à penser que, dans ces cas, la dysglobulinémie est produite par des cellules globulinoformatrices dont l'hyperplasie est secondaire et de nature non directement maligne.

Aussi, en résumé doit-on différencier la prolifération paraplasique ou tumorale des cellules génératrices de globulines, plasmocytes pour la maladie de Kahler, cellules réticulaires et lymphocytaires pour la macroglobulinémie de Waldenstrôm, de la simple hyperplasie de ce système cellulaire survenant secondairement.

L'intrication reste évidemment possible quand on connaît :

— l'unité embryologique des tissus réticulaires et hématopoïétiques dont certaines lignées gardent des potentialités multiples ;

— l'origine cellulaire des globulines immunes qui reste répartie à l'état normal entre ces diverses lignées ;

— la liaison topographique enfin qui existe entre les divers éléments hématopoïétiques et réticulaires, responsable sans doute des désordres secondaires de la synthèse protéique dans certaines affection malignes.

CHAPITRE II

Les Protéines de Bence-Jones

Parmi les protéines que l'organisme humain synthétise, métabolise ou excrète, les protéines de Bence-Jones (B.-J.) constituent une classe très particulière ; elles sont caractérisées par leur poids moléculaire faible et surtout par leur floculation vers 56° C, suivie d'une redissolution lorsque la température s'élève.

Nous avons vu comment Sir Henry Bence-Jones découvrit l'une de ces protéines dans l'urine, qui s'opacifiait vers 56° C, redevenait parfaitement limpide à l'ébullition, puis se troublait à nouveau par refroidissement.

Leur étude revêt un grand intérêt car on ne les décèle jamais dans l'organisme sain et à part quelques rares exceptions, elles n'ont été retrouvées que dans les urines et humeurs de malades atteints de myélome multiple.

Leur découverte est donc d'un intérêt fondamental pour le diagnostic de la maladie de Kahler. De plus, leur thermosolubilité, leur constitution, leur origine et leur métabolisme ont un intérêt théorique majeur, susceptible d'apporter quelques renseignements sur la nature exacte des perturbations métaboliques du myélome multiple.

La propriété fondamentale, celle qui doit servir à leur identification courante est donc la thermosolubilité. Sa fréquence est cependant discutée et l'électrophorèse apporte souvent des résultats plus précieux.

Ceci nous amène à envisager tout d'abord l'aspect physicochimique de la question.

A) PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

1) La thermosolubilité.

a) *La recherche de la protéinurie thermosoluble.*

Elle n'est pas toujours aisée car on peut croire indûment à son existence, mais le plus souvent aussi ne pas la déceler.

La méconnaissance fréquente de la thermosolubilité de protéines urinaires est due au fait que les conditions de salinité et de pH nécessaires ne sont pas réalisées. Elle est en outre parfois masquée par la coexistence d'une protéinurie banale.

Il est donc indispensable d'opérer à un pH légèrement acide, sur des urines fraîchement émises. En effet, on a noté fréquemment

que les urines riches en protéines de B.-J. floculent quelques heures après leur élimination.

Si l'on considère que la floculation traduit une dénaturation déjà avancée, on conçoit que les propriétés fondamentales des protéines puissent être masquées.

En pratique donc, le pH est amené aux environs de 5,5 par quelques gouttes d'acide acétique et un sel neutre est ajouté. L'urine filtrée est chauffée au bain-marie jusqu'à ébullition. Entre 50 et 60° C, la coagulation commence, s'intensifie, puis disparaît entre 95 et 100° C, l'urine redevenant parfaitement limpide. En refroidissant la floculation reparaît.

La plupart des auteurs n'attachent que relativement peu d'importance à la remise en solution à l'ébullition.

Pour Rundles, Cooper et Willett (315), Polonovski et Delbarre (280), c'est bien la précipitation à une température inférieure à 60° C qui est la propriété la plus importante et la plus constante des protéines de B.-J.

D'ailleurs, il semble que le caractère de redissolution du coagulum à l'ébullition puisse être conféré artificiellement ; ainsi Magnus-Levy (102) avait montré qu'en dissolvant dans l'urine une grande quantité d'urée, une protéinurie banale pouvait acquérir la thermosolubilité.

Par contre, des protéines sériques ou urinaires dissoutes dans les urines de myélomateux ne prennent pas pour cela le caractère de thermosolubilité.

Celui-ci est donc lié à une variété spéciale de protéine et non à un état particulier de l'urine dans la maladie de Kahler.

La température à laquelle débute la dénaturation dépend en partie du pH et de la concentration de l'urine en sels neutres : à pH 7 le trouble apparaît vers 56 - 60° C, à pH 5 vers 48 - 50° C.

Les principales causes d'erreurs sont liées à la présence d'une protéinurie banale, souvent associée, à tel point que l'on peut dire avec Polonovski et Delbarre (280) qu'un taux de plus de 10 g d'« albumine » dans l'urine oriente le diagnostic, soit vers un syndrome néphrotique ou une amylose rénale, soit vers un myélome multiple. Celui-ci devra être invoqué également lorsqu'on a l'impression que le coagulum est moins abondant à l'ébullition qu'à 80° C, réserve faite que, très souvent, le coagulum se ramasse, se condense, donnant faussement l'impression de devenir moins abondant.

Le moyen le plus simple et le plus rigoureux consiste à filtrer à l'ébullition l'urine acidifiée et salifiée et à observer si le filtrat se trouble lors du refroidissement. Une telle opacification signe alors la présence d'une protéine de B.-J.

Enfin, en l'absence d'albuminurie vraie, on peut aussi rechercher la protéine de B.-J. par l'acide nitrique, l'acide trichloracétique, le réactif d'Esbach ou le propanol suivant la technique de Jirgensons et coll. (180) qui aurait l'avantage de floculer séparément la protéine de B.-J. pour une concentration en propanol de 15 à 25 vol. %.

b) *Le dosage.*

Le dosage est, dans les cas précédents, facile : les protéines sont coagulées à 70° C, ramassées par centrifugation, lavées successivement au sérum physiologique, à l'eau distillée, à l'alcool absolu, puis à l'éther anhydre, séchées sous vide, et la poudre obtenue pesée.

Quand existe une protéinurie banale, le dosage est infiniment plus délicat car, si théoriquement il suffit de traiter comme précédemment le filtrat passant à l'ébullition, en réalité, on ne retrouve jamais la totalité des protéines thermosolubles qui restent plus ou moins adsorbées sur le coagulum d'albumine.

Le dosage de la protéine de B.-J. reste donc entaché d'erreur mais en pratique il n'est pas nécessaire d'avoir une grande précision.

Les taux urinaires de protéine de B.-J. sont d'ailleurs variables d'un malade à l'autre et aussi chez un même sujet.

Ils peuvent être en moyenne d 2 à 20 g p. 1 000 mais il peut exister des quantités beaucoup plus élevées : 60 g dans le cas princeps de Bence-Jones, 42 g dans un cas de Di Guglielmo (87).

Nous verrons par ailleurs que lorsque la protéinurie est abondante, supérieure à 5 g p. 1 000, l'électrophorèse permet de doser aisément la concentration protéique dans l'urine.

c) *Fréquence du phénomène.*

Pendant longtemps il a été admis que la protéinurie de B.-J. faisait partie intégrante du syndrome caractérisant le myélome multiple et sa présence était considérée comme nécessaire pour affirmer le diagnostic.

En réalité, l'appréciation exacte de la fréquence de ce syndrome est difficile quand on voit que la protéinurie thermosoluble peut être intermittente, passagère, précoce ou tardive et il faudrait alors suivre les malades durant toute l'évolution de la maladie en pratiquant des examens urinaires rapprochés.

Il est bien démontré aujourd'hui qu'il existe des maladies de Kahler sans protéinurie de B.-J. Magnus-Levy (210) déjà, notait sa présence dans 75 % des cas, Gechickter et Copeland dans 65 % des cas. Pour les statistiques plus récentes, la fréquence est encore moindre : Batts (19), Bayrd et Heck (21) proposent le taux de 50 % environ. Delbarre (76) ne trouve que 33 % avec une protéinurie thermosoluble pure dans 1/6 des cas et une albuminurie associée dans une autre 1/6. Burtin et coll. (45) cependant retrouvent un pourcentage élevé : 19 fois sur 24 myélomes, soit près de 80 % par précipitation à 56° C, mais ces auteurs insistent sur le fait que de faibles traces de précipité à cette température (8 fois sur 19) ne doivent pas être négligées car elles ont pratiquement la même valeur séméiologique.

De toute façon l'atteinte rénale vraie, avec albuminurie banale, est aussi fréquente que la protéinurie thermosoluble et l'absence de celle-ci ne doit absolument pas faire rejeter le diagnostic.

Enfin, il est à noter que les malades ayant une protéinémie peu perturbée ont souvent une élimination urinaire de protéine de B.-J.

alors qu'inversement les hyperglobulinémies importantes ne présentent qu'exceptionnellement une forte protéinurie, comme s'il existait un balancement entre les deux troubles protéiques, sérique et urinaire.

2) Purification et cristallisation des protéines de B. J.

Il est remarquable que la protéine de B.-J., produit d'excrétion dont l'origine exacte est encore assez mal déterminée et dont les propriétés diffèrent d'un cas à un autre, ait été une des premières protéines obtenue purifiée et cristallisée ; d'autant plus que l'on connaît la difficulté d'obtenir des globulines pures cristallisées.

La première oobservation a été faite en 1900 par Magnus-Levy et depuis il a été constaté à diverses reprises que la protéine cristallisait spontanément, soit dans l'urine (Wilson) (383), soit dans la moelle où des dépôts de protéine de B.-J. ont été décelés par Glauss (131), englobés dans des dépôts de substance amyloïde. Lohlein en a retrouvé dans des canalicules rénaux.

La technique habituelle, pour obtenir la cristallisation, est celle d'Hewitt (164) utilisant le sulfate d'ammonium à une concentration légèrement inférieure à celle de la précipitation, à pH 5. Au bout d'un certain temps des cristaux apparaissent, rhomboédriques ou en aiguilles.

Cependant il existe des protéines de B.-J. que l'on ne peut cristalliser, probablement en raison de l'hétérogénéité de la protéine ou de la souillure par des pigments urinaires.

Parfois aussi cette cristallisation peut être obtenue par dialyse prolongée contre de l'eau distillée froide suivant la technique caractéristique pour les γ-globulines : Putnam, Meyer et Mihyake (298), mais les cristaux peuvent se redissoudre à chaud.

De toute façon, l'obtention de cristaux à partir de solution de protéine de B.-J. n'implique pas que l'on soit en présence d'une préparation particulièrement pure et homogène, Polonovski et Delbarre (280).

Par ailleurs, les protéines de B.-J. peuvent être isolées et purifiées par précipitation aux sels neutres : sulfate d'ammonium 3 M (Putnam et Stelos) (292), sulfate d'ammonium à 60 % et à pH 5,5 (Rundles, Cooper et Willett) (315), chlorure de sodium à 40 %, à pH 5 et 4° C (Collier, Reich et King) (59) (60), ou enfin par action de l'acétone à — 5° C.

3) Données de l'électrophorèse.

La recherche du phénomène de thermosolubilité étant, nous l'avons vu, inconstante, souvent imprécise, l'électrophorèse représente le moyen le plus commode, sinon le plus sûr, pour déceler et identifier une protéine de B.-J.

a) *Electrophorèse libre et sur papier.*

Wuhrmann et Wunderly, Rundles, Soulier, Fauvert et Hartmann, Burtin et bien d'autres auteurs ont montré que ces protéines avaient toujours une mobilité de globulines.

Classiquement elles migrent en électrophorèse sur papier comme des β- ou γ-globulines, sous forme d'une fraction homogène et isolée, plus ou moins décalée par rapport à la paraprotéine sérique.

On peut trouver, par exemple, une protéine pure de mobilité β ou β-γ, alors que l'on s'attendait à trouver une protéinurie banale.

L'inconvénient majeur de la méthode électrophorétique est de nécessiter une teneur en protéines urinaires de l'ordre de 5 g p. 1 000 au minimum. Sinon il faut concentrer les urines par dialyse contre une solution de polymères : dextrane ou polyvinylpyrrolidone. Ainsi Fauvert et Hartmann (108) ont décelé 34 fois sur 34, un constituant à mobilité β-γ.

Comme le soulignent Burtin et coll. (45), la constatation sur le tracé électrophorétique d'une seule tache entre les zones α_1 et γ permet, non d'affirmer, mais de considérer comme très vraisemblable l'existence d'une protéinurie de B.-J.

Toutefois les protéines de B.-J. varient largement suivant la mobilité électrophorétique, l'homogénéité et le point isoélectrique, révélant bien que les protéines excrétées par différents malades ne sont pas identiques. Des courbes complètes de mobilité en veine liquide, à divers pH, pour quelques échantillons de B.-J. ont été publiées par Putnam et Udin (291). Les points isoélectriques varient depuis 4,5 jusqu'à 6,7 avec des différences correspondantes dans les courbes de mobilité.

Examinée à pH 8,6 en tampon véronal de force ionique 0,1, la mobilité est toujours inférieure à celle de l'albumine et des globulines α_1. Elle est généralement comprise dans des limites assez larges : entre 0,1 et 4,7 - 10^{-5} pour Putnam et Stelos, entre 1,2 et 4,1 pour Rundles (315), entre 0,8 et 3,8 pour Ten-Thije (362). Cependant, il ne semble pas qu'il y ait de relations entre la mobilité électrophorétique ou le point isoélectrique des protéines de B.-J. et la globuline anormale sérique, puisque comme nous l'avons dit, les positions sont voisines, juxtaposées quelquefois, mais non déterminables à l'avance.

Un aspect particulier est cependant à noter en électrophorèse libre : l'étalement du pic, observé dans diverses conditions de pH, sans nette séparation en plusieurs sommets. Ceci peut résulter, soit de la présence de plusieurs protéines de comportement électrophorétique similaire que le champ électrique ne peut séparer, soit de l'existence de complexes se dissociant plus ou moins lors de l'application du courant. Ainsi au-dessous de pH 4, il semble qu'un début de résolution en plusieurs composants se dessine, ce qui traduit vraisemblablement une hétérogénéité moléculaire (Putnam et Stelos) (292).

Ces données sont d'ailleurs à rapprocher :

— des résultats obtenus par Ferrini, Antonini et Caputo (110) qui ont observé qu'à pH 3,5 une protéine de B.-J. apparemment homogène et de poids moléculaire 60 000, se dissociait lentement en plusieurs fragments plus petits de poids moléculaire d'environ 10 000, après 20 à 38 heures.

— des résultats de l'électrophorèse en gel d'amidon.

b) *Electrophorèse en gel d'amidon.*

L'électrophorèse en gel d'amidon, selon la technique de Smithies (344) (345) montre effectivement qu'une protéine de B.-J. apparemment homogène en électrophorèse sur papier, peut être décomposée en plusieurs fractions, de mobilité légèrement différente et donnant dans le gel une série de bandes.

Ainsi Flynn et Stow (118) examinant treize urines de myélomateux, avec protéinurie de B.-J. homogène en électrophorèse sur papier, décelèrent dans 10 cas une hétérogénéité nette avec 2 à 5 bandes différentes. L'appartenance de ces bandes à la protéine de B.-J. a été reconnue par l'étude en gel de la fraction électrophorétique sur papier correspondant à la protéine de B.-J. La comparaison entre le comportement électrophorétique de l'urine en gel et sur papier, montra que les protéines γ sur papier correspondaient à des γ lentes en gel, alors que les protéines de mobilité β sur papier avaient dans le gel d'amidon une mobilité β ou parfois α_2 « rapide ».

La comparaison entre sérum et urines enfin, révéla que les mobilités en gel d'amidon étaient rarement identiques pour la paraprotéine sérique et la protéine urinaire, sauf dans un seul cas.

On voit donc l'intérêt de cette méthode dont les résultats sont supérieurs à ceux de l'électrophorèse de zone sur papier et qui apporte un argument de valeur à l'hétérogénéité des protéines de B.-J.

4) **Les données de l'ultracentrifugation. Poids moléculaire.**

La propriété physique la plus significative des protéines de B.-J. est leur faible poids moléculaire, qui est plus bas que celui de toutes les protéines normales, en dehors de certaines α-glycoprotéines.

Bien que les premières déterminations de Gutman (147) et Svedberg (359) aient donné un poids moléculaire de 35 à 37 000, les estimations plus récentes de Caputo (49), Putnam et Stelos (292), Rundles, Cooper et Willett (315) s'accordent sur un poids voisin de 45 000.

La constante de sédimentation, S_{20} des protéines de B.-J. est peu affectée par la concentration protéique, ce qui suggère que ces molécules tendent vers une forme sphérique. Toutefois de larges variations de cette constante, pour divers spécimens de protéines de B.-J., ont été notées avec fréquemment des valeurs de 2,8 S et 3,4 S, correspondant donc à deux classes de taille différente.

Bien que Rundles et coll. (315) aient trouvé des valeurs de 2,4 à 4,4 S, les autres auteurs, tels que Ten-Thije (362), Putnam et Stelos (292) ont noté des valeurs plus limitées, groupées entre 3,08 et 3,67 S ou entre 2,14 et 3,46 S (Putnam et Miyake (300).

Dans l'ensemble, la valeur moyenne de la constante de sédimentation est de 3,4 S, avec un constante de diffusion de 7,7 unités Fick donnant donc un poids moléculaire moyen de 44 000, c'est-à-dire environ 1/4 de celui des γ-globulines comme le souligne Charvillat (55).

On est frappé par le fait que ces protéines de faible poids moléculaire migrent néanmoins comme des β- ou γ-globulines, beaucoup plus lourdes.

Il est, en outre, intéressant de noter :

— que ce nombre de 44 000 représente deux fois le poids moléculaire correspondant à une constante de 2,8 S ;

— et que d'autre part, les produits de digestion papaïnique de γ-globulines humaines ont une constante de 3,5 S (Stiehm, Morton et Deutsch) (358).

En dépit des divergences rapportées sur la constante de sédimentation des protéines de B.-J., la majorité de celles-ci apparaissent homogènes en ultracentrifugation, bien que Putnam et Stelos (292) aient observé quelques échantillons manifestement hétérogènes et vraisemblablement dégradés. Dans ce cas, l'électrophorèse confirmait l'hétérogénéité. Mais la superposition entre ces deux méthodes, électrophorèse et ultracentrifugation n'est pas constante, et Creyssel (65) a noté par exemple un composant unique à l'ultracentrifugation correspondant à deux pics électrophorétiques distincts.

La diversité des protéines de B.-J. existe cependant, sans doute établie autour de prototypes appartenant à la classe 3,4 S et il serait intéressant :

— de savoir s'il existe une variabilité dans la protéine excrétée par un même malade ;

— de connaître exactement les réactions de labilité de ces protéines, puisque par exemple à pH 4, se produisent, comme nous l'avons vu, des changements moléculaires.

5) **Chromatographie sur cellulose.**

L'hétérogénéité que décelait l'électrophorèse en gel d'amidon, peut être retrouvée par chromatographie sur résines échangeuses d'ions, comme les celluloses substituées.

Ainsi Lynn, Phelps et Putnam (202), Jirgensons, Ikenaka et Gorguraki (180) ont montré qu'au moins trois composants chromatograhiques pouvaient être élués, à partir de colonnes de DEAE-cellulose grâce à un système tampon phosphate réalisant un gradient entre 0,005 et 0,02 M.

Les 2 premières fractions seulement étaient homogènes en ultracentrifugation.

En résumé, les propriétés physicochimiques des protéines de B.-J. sont donc très importantes puisque, parmi elles, deux sont utilisées couramment pour leur recherche : la thermosolubilité après coagulation autour de 56° C et les propriétés électrophorétiques révélant une mobilité de type β globulinique en général.

Elles montrent également les différences qui existent entre les protéines de B.-J. de différents malades : Putnam et Miyake (294) (300), et Ten-Thije (362).

Chez un même sujet, il y a certes des variations quantitatives dans l'excrétion d'un moment à l'autre, mais la nature même de la protéine excrétée reste constante en regard des propriétés électrophorétiques, de la vitesse de sédimentation et de la précipitation par des solutions salines à concentration déterminée. Toutefois, Witte

a observé dans un cas, des changements importants du comportement électrophorétique d'une protéine de B.-J. hétérogène, mais cristallisable. De même Putnam et Miyake (302) ont constaté une modification nette du tracé électrophorétique des urines d'un malade ayant reçu de la radiothérapie.

Il semble, néanmoins, que lorsque l'état rénal n'est pas trop altéré, la constance de l'excrétion de la protéine de B.-J. soit régulière.

B) PROPRIETES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

1) Composition en acides aminés.

Plus que la composition chimique élémentaire, montrant une teneur en soufre et phosphore particulièrement variable, l'étude des amino-acides constitutifs permet une bonne individualisation de la protéine.

Malheureusement, nombre de statistiques antérieures à 1940, résumées en particulier par Devine (86), Roberts, Ramasarma et Lewis (310), sont difficiles à interpréter étant donné le peu de valeur et de spécificité des techniques de dosages employées.

Depuis, les méthodes chimiques, microbiologiques et chromatographiques ont permis de mieux connaître la répartition et la nature des amino-acides.

Le premier fait ayant attiré l'attention est l'absence ou la faible teneur en méthionine : Polonovski et Delbarre (280), Dent et Rose (77). Ces derniers, utilisant cinq méthodes d'analyse, ne détectèrent pas cet amino-acide et par analogie avec son absence dans certains virus pensèrent pouvoir élaborer une théorie virale du myélome plasmocytaire.

Papastamatis et coll. (269), Roberts et coll. (310), Schreier (327) (328), utilisant la méthode microbiologique, ont encore noté l'absence de méthionine ; puis sa présence fut établie au taux minimum de 0,35 % ou de une molécule-gramme pour une mole de protéine, de poids moléculaire 40 000. Agren (6), Baars (18), Deutsch (80), Jirgensons et coll. (178), Vis et Crokaert (369) rapportent cinq cas où cet acide aminé n'est pas dosable, essentiellement dans des protéines de mobilité électrophorétique faible, alors qu'ailleurs le taux maximum est de 1,1 % soit 3 à 4 restes de méthionine pour un poids moléculaire de 40 000.

Les autres amino-acides usuels sont présents dans la molécule (Polonovski et Delbarre) (279) (282) et le pourcentage de certains amino-acides varie d'une manière appréciable d'un échantillon à l'autre avec une variabilité des taux de phénylalanine, de tyrosine et de proline particulièrement nette.

La concentration de certains acides aminés est en effet élevée : Jirgensons et coll. (178), Crokaert (369) notent une grande richesse en hydroxyamino-acides (sérine et thréonine) et c'est là un élément caractéristique, car le taux des autres acides aminés diffère souvent beaucoup d'un auteur à l'autre et d'une protéine à l'autre. Chez un même sujet, Jirgensons a également trouvé des différences de composition dans des échantillons prélevés à diverses périodes d'évolution de la maladie et aussi des différences suivant le mode de préparation des protéines de B.-J. (précipitation acétonique, précipitation par la chaleur ou par des sels neutres, etc.).

La composition des protéines de B.-J. les distingue nettement de l'osséine dont certains auteurs ont voulu la faire dériver. En effet, l'osséine ne contient ni tryptophanne, ni cystine et elle est beaucoup plus riche en arginine et glycocolle.

Vis et Crokaert (369) ont publié une étude comparative de protéines de B.-J. et d'un certain nombre de protéines bien caractérisées, analysées par chromatographie sur échangeurs d'ions, après hydrolyse, suivant la technique de Moore et Stein. Pour les 14 protéines de B.-J. étudiées, ils rapportent une composition voisine de celle des γ-globulines, avec en particulier une haute teneur en thréonine et sérine. Les 14 échantillons correspondent assez bien, quant à leur composition, aux globulines myélomateuses étudiées par Smith et coll. (343).

2) **Nature des groupements terminaux.**

a) *Groupes N-terminaux.*

L'identification des groupements N-terminaux a été faite, dans 7 cas de protéinurie de B.-J. par Biserte (30), Biserte et Dautrevaux (31), grâce à la chromatographie sur papier des DNP-amino-acides.

Ils relèvent ainsi la présence de l'acide aspartique dans cinq cas, de la valine dans deux échantillons.

Les travaux de Putnam et Miyake (294) (300) ont mis en évidence des différences structurales entre diverses protéines de B.-J., nouvel argument en faveur de leur non-identité. Ils classent ainsi ces protéines en deux groupes A et B, antigéniquement distincts :

— Le groupe A est caractérisé par l'absence de l'acide aspartique en position terminale ; celui-ci est ou n'est pas remplacé par la tyrosine, la thréonine ou l'isoleucine.

— Le groupe B au contraire, est défini par la présence de l'acide aspartique terminal exclusivement.

Les analyses d'autres auteurs, tels que Drèze (89), Grümer et Ruske (146) confirment la fréquence de l'acide aspartique N-terminal, même lorsque les protéines diffèrent notablement dans leur composition en acides aminés ; valine, lysine et acide glutamique N-terminaux y sont aussi rencontrés.

Les propriétés chimiques ne semblent pas dépendre de l'acide aminé N-terminal ; la protéine de B.-J. et la paraprotéine homologue

n'ont aucune corrélation quant à la nature ou à l'abondance du radical N-terminal.

b) *Groupes C-terminaux.*

Peu de résultats ont été rassemblés sur les groupes C.-terminaux. La détermination des groupements α-carboxyliques libres, effectuée par chromatographie bidimensionnelle des thiohydantoïnes formées par action du thiocyanate d'ammonium sur la protéine, selon la technique de Dautrevaux et Biserte (74) ont permis à ces auteurs (31) de déceler trois fois la thréonine et une fois la tyrosine sur quatre cas.

Drèze (89) par la méthode à la carboxypeptidase, a noté deux fois la présence de leucine C-terminale, alors que, dans la séquence C-terminale, acide glutamique, lysine, glycocolle, sérine et thréonine, sont retrouvés en position indéterminée.

Par la même technique, Caputo (49) a pu déterminer la séquence C-terminale d'une protéine de B.-J. qui serait établie ainsi :
Leu - Ala - Glu - Val.

De toute façon, les résultats peuvent être très divers, comme l'expliqueront d'ailleurs l'origine et la biosynthèse de ces protéines.

3) **Teneur en glucides et lipides.**

a) *Glucides.*

Selon la plupart des auteurs dont Osserman et Lawlor (253), Putnam et Miyake (300), Vis et Crokaert (369), Sonnet, Louis et Heremans (348), Maiorca (211), les protéines de B.-J. diffèrent notablement des γ-globulines et des globulines anormales sériques par leur pauvreté en substances glucidiques. Car si Caputo (49) a noté pour un échantillon un taux glucidique de 9,4 %, et si Schrade, Böhle, Biegler et Bruch (326) ont observé des pourcentages de 2,9 à 5,4 %, dans la plupart des cas et en particulier dans la série de Vis et Crokaert (369), hexoses et hexosamines sont, soit absents, soit en quantité très faible.

La coloration à l'acide periodique-réactif de Schiff est généralement négative.

b) *Lipides.*

De même que pour les paraprotéines sériques, les électrophorégrammes de protéines de B.-J. montrent, après coloration par le Noir Soudan, une tache assez faiblement colorée mais nette au niveau de la protéine.

Schrade et coll. (326) ont particulièrement étudié les lipides de huit protéines de B.-J. et leurs résultats quantitatifs sont les suivants :

— L'extraction lipidique fournit une quantité de lipides totaux allant de 0,55 à 2,2 % du poids total. Le taux le plus élevé est toujours rencontré dans les protéines à mobilité électrophorétique grande, alors que les protéines lentes paraissent beaucoup plus pauvres.

— Cholestérol et phosphore lipidique sont tous deux présents (275 à 790 mg de cholestérol libre pour 100 g de protéine).

— Les acides gras ont été étudiés par spectrographie après isomérisation alcaline et chromatographie sur papier imprégné d'huile de paraffine. Les acides linoléique, linolénique et arachidonique ont été décelés à côté d'acides saturés.

— Après extraction des lipides totaux par alcool-éther, l'électrophorégramme prend toujours la coloration au Noir Soudan. Ces auteurs, faisant une nouvelle extraction, après saponification, retirent effectivement encore des lipides, en quantité moindre, avec toujours du cholestérol, des phospholipides et des acides gras, pour lesquels la chromatographie par la méthode de Kaufmann et Nitsch montre cette fois au moins 6 taches différentes.

La composition lipidique est donc très particulière, très dissemblable de celle des β- et α-lipoprotéines sériques et également de celle des γ-globulines humaines. De celles-ci en effet, Schultze et coll. (330) n'ont pu extraire que 0,2 % environ de lipides, Schradf et coll. (326) 0,36 % après deux extractions.

On voit donc que, comme pour les protéines sériques, le problème se pose de savoir s'il s'agit de lipides adsorbés ou de lipides faisant partie intégrante de la molécule.

4) **Etudes des peptides libérés par hydrolyse enzymatique.**

Les études précédentes sont incapables, nous le voyons, d'apporter des renseignements sur la structure intime des protéines de B.-J.

Il paraît possible cependant, que les similitudes grossières, associées aux variations individuelles de ces protéines, reflètent des différences dans la séquence des acides aminés ; celles-ci pouvant survenir en des zones internes ou terminales d'une structure primaire commune, elle-même pouvant être assez voisine de celle des γ-globulines.

C'est dire l'intérêt de l'étude chromatographique d'hydrolysats enzymatiques suivant le même processus que celui décrit déjà pour les protéines anormales du sérum. Ces travaux sont l'œuvre de l'école de Putnam : Fried, Frankel et Putnam (123), Fried et Putnam (125), Putnam et Fried (301) et de Ferrini et Zito (111).

Ces auteurs ont hydrolysé par la trypsine des protéines de Bence-Jones préalablement isolées et purifiées par diverses méthodes physico-chimiques ; l'action enzymatique a été faite, soit sur des molécules entièrement dénaturées, soit sur des protéines oxydées d'abord par l'acide performique ou divers autres agents.

Ils ont ainsi constaté qu'il existait suivant les échantillons de notables différences entre les chromatogrammes sur résines ou les cartes d'électrochromatographie affirmant ainsi une nouvelle fois la non-identité entre chacune de ces molécules. De même l'hétérogénéité se retrouve dans les hydrolysats de sous-fractions de protéines de B.-J. obtenues par chromatographie sur résine échangeuse d'anions.

Enfin, alors que les chromatogrammes peptidiques de γ-globulines normales et de paraprotéines myélomateuses hydrolysées par la

trypsine révèlent l'identité de structure de nombreux segments, ici aucun fait similaire n'est observé. Aucune analogie réelle ne peut être notée entre les chromatogrammes peptidiques de protéines B.-J. et ceux de γ-globulines, en dépit des similitudes immunologiques. Et ici encore intervient l'hétérogénéité des γ-globulines, famille protéique que l'on peut difficilement comparer à une protéine bien individualisée comme la protéine de B.-J.

Quoi qu'il en soit c'est certainement par ces techniques d'hydrolyse puis de séparation par chromatographie des peptides obtenus, qu'avancera la détermination structurale de ceux-ci d'abord, de leur enchaînement, puis peut-être de la molécule entière.

De même la réduction des ponts disulfures semble être une technique féconde et dans le cas des protéines de B.-J. elle conduit à une dissociation qui, en gel d'amidon se traduit par l'apparition de deux bandes nettes, de mobilité identique à certaines bandes de la protéine myélomateuse sérique correspondante (Fig. 5).

Ces faits sont en accord avec la dissociation des protéines de B.-J. à pH bas et avec l'hypothèse que les protéines ont une partie de leur chaîne identique à celle de la protéine sérique du même malade (Poulik et Edelman) (289).

En résumé, nous voyons maintenant que les protéines de B.-J. diffèrent entre elles par certains critères : mobilité électrophorétique, groupes N-terminaux, composition en amino-acides, chromatogrammes peptidiques.

Elles ont cependant des propriétés communes : précipitation à température moyenne, puis thermosolubilité, poids moléculaire et constante de sédimentation, enfin relations immunologiques avec les γ-globulines, ce que nous devons maintenant envisager.

C) PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

1) Etude immunochimique.

Peut-être parce que les recherches immunologiques sur les protéines de B.-J. ont été commencées avant que ne soit connue l'hyperglobulinémie du myélome, la parenté entre ces protéines urinaires et les γ-globulines n'a pas, au début, été discernée.

Les premiers essais d'Abderhalden et Rostoski (1) furent imprécis car l'antisérum de lapin obtenu avec des protéines urinaires, renfermait surtout des anticorps dirigés contre diverses protéines sériques, éliminées dans l'urine.

Massini (220), Baynes-Jones et Wilson (20), Hektoen et Welker (159) montrèrent ensuite que divers types antigéniques pouvaient être observés pour les protéines de B.-J. qui présentaient, entre elles, des différences immunologiques. Les immunsérums de ces auteurs, en effet, réagissaient avec les protéines sériques normales, mais

après épuisement par celles-ci, la réaction avec la protéine de B.-J. persistait, confirmant donc bien la différence immunologique avec les protéines sériques.

Collier et Jackson (60), au contraire, pensèrent que ces protéines n'étaient pas antigéniquement reliées aux protéines sériques ; dans la description d'un test de précipitation, Collier et coll. (59) notèrent que, d'une part tous les cas étudiés étaient immunologiquement identiques, et que d'autre part ils ne réagissaient pas avec un sérum anti-γ-globulines.

La question était donc très confuse et il fallut attendre 1955-56 pour obtenir quelques éclaircissements apportés par de nombreuses publications.

a) *Relations entre protéines de B.-J. et γ-globulines.*

Deutsch et coll. (81) appliquant des réactions d'inhibition, montrèrent que des protéines de B.-J. très purifiées avaient des similitudes immunologiques avec les globulines sériques normales.

Korngold et Lipari (189), Burtin, Hartmann, Fauvert et Grabar (45), utilisant la méthode de double diffusion en gélose d'Ouchterlony (259), constatèrent que la différence entre protéines de B.-J. et globulines sériques n'est que partielle puisque les protéines de B.-J. donnent une réaction croisée avec les γ-globulines normales, lorsqu'elles sont révélées par un immunsérum de cheval anti-sérum humain normal. Un immunsérum de lapin ou d'âne anti-γ-globuline donne des résultats plus inconstants.

Ten-Thije (362) conclut aussi, qu'un antisérum dirigé contre ces protéines urinaires réagissait toujours avec les protéines sériques, malgré l'absence d'analogie physicochimique entre ces deux classes protéiques.

Par l'analyse immunoélectrophorétique, Burtin et coll. (44) (45), Grabar (140), puis Fauvert et coll. (139), révélèrent que toutes les protéines de B.-J. donnaient une réaction croisée avec les γ-globulines.

Scheidegger et Buzzi (322) étudiant les γ-globulines du point de vue immunochimique, observèrent que les protéines de B.-J. possédaient chacune un déterminant antigénique particulier appartenant à l'un des quatre connus ; ce déterminant appartient à la mosaïque des déterminants γ normaux, expliquant ainsi que les réactions dites « croisées » ou d'« identité partielle » doivent être interprétées non comme une vague parenté immunologique mais comme l'identité absolue d'un ou plusieurs déterminants, partagés par les antigènes en cause. Les protéines de B.-J. possèdent donc partiellement la structure des γ-globulines, ce qui laisse penser qu'elles sont bien issues d'un métabolisme vicié de celles-ci.

b) *Diversité des protéines de B.-J.*

Soulevé dès 1907 par Ville et Derrien, le problème fut abordé par Baynes-Jones et Wilson (20), Hektoen et Welker (159) qui observèrent que les protéines de B.-J. étudiées étaient différentes entre elles et qu'elles pouvaient être classées en deux groupes.

Korngold et Lipari (189), Burtin et coll. (45) étudièrent particulièrement cette question.

Comparant deux à deux diverses protéines de B.-J. par diffusion en plaque de gélose, ces auteurs observèrent que tantôt les deux protéines étudiées donnaient des réactions d'identité, tantôt apparaissaient complètement différentes. Ceci permit de les classer en plusieurs groupes suivant leur comportement :

— Le groupe I, le plus important, réunit les protéines de B.-J. les plus homogènes qui réagissent avec l'antisérum humain normal (A.S.H.N.) et l'immunsérum anti-γ-globulines (S.A.-γ) et qui donnent entre elles une réaction d'identité par rapport aux deux immunsérums précédents ;

— le groupe II est formé par les protéines de B.-J. précipitant avec l'A.S.H.N. de cheval mais pas avec le S.A.-γ d'âne ou de lapin, et donnant entre elles des réactions d'identité seulement lorsqu'elles sont développées par le S.A.H.N. polyvalent de cheval ;

— le troisième groupe enfin, range des protéines diverses, isolées ou associées à des protéines de B.-J. d'un des deux groupes précédents et qui réagissent mieux avec l'A.S.H.N. qu'avec le S.A.-γ.

De cette classification doivent être dégagés quelques éléments :

— l'association avec une protéinurie banale n'a aucun rapport avec le groupe d'appartenance de la protéine de B.-J. ;

— l'importance de l'élimination urinaire n'intervient pas non plus bien que l'on ait constaté que les protéines de B.-J. du troisième groupe étaient souvent en quantité très faible dans l'urine, alors qu'une émission massive était un peu plus fréquente dans le groupe II.

— des corrélations entre le type antigénique et les propriétés physiques et chimiques peuvent être observées : ainsi, par exemple, les protéines du groupe I de Korngold n'avaient pas d'acide aspartique N-terminal qui, par contre, était présent dans celles du groupe II : (Putnam et Miyake) (300). De même le groupe I avait des courbes de précipitation thermique à 45-60° C et à des pH variables plus aiguës et plus symétriques.

Cependant, aucune relation nette n'a pu être encore trouvée entre le type antigénique et des propriétés telles que la constante de sédimentation ou la mobilité électrophorétique, bien que l'hypothèse de Scheidegger et Buzzi (322) apporte quelques données intéressantes.

Ces auteurs expliquent la diversité antigénique des protéines de B.-J. par la présence sur chacune de ces molécules d'un déterminant particulier appartenant au motif antigénique des γ-globulines et accompagnant le ou les déterminants propres des protéines de B.-J.

Il faut en effet noter que, lorsqu'on étudie chacun de ces groupes avec un immunsérum anti-B.-J., difficile à obtenir car ces molécules sont de mauvais antigènes, il se révèle hétérogène. Ceci laisse entrevoir que chaque protéine de B.-J. diffère, dans le groupe, par sa

constitution antigénique propre. La partie commune à toutes les protéines de B.-J. d'un même groupe est seulement le déterminant γ.

Pour révéler ces divers déterminants γ, dont l'un quelconque est présent sur chaque protéine de B.-J., il faut donc un immunsérum contenant des anticorps dirigés contre ces déterminants, ce qui explique que certains antisérums polyvalents ou anti-γ ne révèlent pas les protéines de B.-J. alors que d'autres les révèlent.

Comme ces quatre déterminants sont portés simultanément par la γ-globuline normale on peut donc admettre la libération par les cellules tumorales, de fragments de γ-globulines en cours de synthèse, mais il faut alors aussi admettre que cette synthèse débute, selon les individus, par un point différent, quelconque, de l'édifice.

c) *Rapports entre protéines de B.-J. et protéines sériques myélomateuses.*

Toujours grâce à la méthode d'Ouchterlony, Burtin et coll. (45) ont pu envisager les rapports entre la protéine de B.-J. urinaire et les protéines sériques myélomateuses.

Dans le sérum de certains malades ayant une grosse excrétion de protéines de B.-J., ils ont en effet retrouvé une protéine ayant les mêmes réactions que celle-ci vis-à-vis de l'A.S.H.N. et éventuellement de l'A.S.-γ, mais ne présentant avec la protéine de B.-J. elle-même qu'une réaction croisée et non une réaction d'identité complète.

Nous avons vu par ailleurs, notamment par l'immunoélectrophorèse, que la présence dans le sang de protéine de faible poids moléculaire du type B.-J. avait été bien démontrée. S'il est logique d'admettre que la protéine urinaire dérive directement de la protéine sérique, même lorsque la très faible teneur en protéine sérique rend sa détection impossible, le problème de leur identité réelle reste mal résolu.

Moore, Kabat et Gutman (229) essayant de doser immunologiquement une protéine de B.-J. sérique avec un immunsérum préparé avec la protéine de B.-J. urinaire du même malade, avaient noté que la protéine sérique était sans doute hétérogène.

Korngold et Lipari (189) sont arrivés à cette même conclusion de différence partielle, la protéine urinaire ne renfermant pour eux qu'une partie des déterminants antigéniques de la protéine sérique.

D'autre part certains des immunsérums préparés par Wuhrmann, Wunderly et Hassig (387) avec des protéines sériques myélomateuses, ne réagissaient pas du tout avec la protéine de B.-J. des mêmes malades, en accord ainsi avec certains des résultats de Burtin et coll. (45).

Morton et Deutsch (233) par l'étude comparative entre des anticorps de lapin anti-B.-J. et antiprotéines sériques myélomateuses, ont pu montrer que les protéines de B.-J. présentaient une plus grande similitude immunochimique avec les protéines sériques homologues que vis-à-vis de protéines hétérologues ou des γ-globulines normales.

Enfin pour Scheidegger et Buzzi (322), les paraprotéines sériques myélomateuses sont des γ-globulines anormales, γ-globulines incomplètes auxquelles il manque un ou plusieurs déterminants. Quelle que soit leur mobilité électrophorétique, elles ont toute en commun un déterminant particulier et peut-être y aurait-il donc une analogie plus grande avec les protéines de B.-J. de ce même type antigénique.

Il est néanmoins bien difficile de conclure actuellement.

2) **La détection immunologique des protéines de Bence-Jones.**

Les méthodes immunologiques représentent un procédé très sensible de détection des protéines de B.-J. dans l'urine.

On peut utiliser : soit la méthode de l'anneau de Collier et coll. (58) (59), soit la méthode de diffusion en milieu gélifié.

a) La méthode du « ring test » de Collier consiste à obtenir un immunsérum de lapin par injection de protéine de B.-J. très purifiée associée à l'adjuvant de Freund (122) et à placer cet antisérum en contact avec l'urine dans un tube. L'existence d'un précipité à l'interface urine-immunsérum, traduit la positivité de la réaction.

Sur 1 000 examens, cet auteur a trouvé 57 réactions positives dont 53 étaient des myélomes multiples et 3 des plasmocytomes solitaires.

Sur les 53 myélomes, 20 cas seulement avaient été décelés avant l'utilisation du test de précipitation spécifique et sur ces 20 cas la recherche de la protéine de B.-J. par la chaleur avait été positive 11 fois.

Le diagnostic a été donc établi uniquement par la méthode immunologique dans 60 % des cas.

Pour l'auteur, la valeur de ce test est également démontrée par l'absence de réactions faussement positives ; du fait de la sensibilité de la méthode le « ring test » serait positif très précocement. Toutefois, ces résultats paraissent actuellement critiquables car ils supposent une unité et une similitude antigénique des protéines de B.-J., que, comme nous venons de le voir, l'on n'admet plus maintenant.

b) La précipitation en milieu gélifié peut être effectuée en boîte de Petri suivant la technique d'Ouchterlony ou par immunoélectrophorèse.

Burtin et coll. (45) utilisant un immunsérum de cheval antisérum humain normal contenant une quantité élevée d'anticorps anti-γ-globulines, ont, pour 24 urines de maladie de Kahler, obtenu les résultats suivants :

La protéine de B.-J. a été trouvée présente dans toutes les urines de myélome étudiées sauf une ;

— neuf fois elle existait en grande quantité et une protéine identique était retrouvée dans le sérum ;

— dans sept cas la présence était nette ;

— dans les autres cas enfin les urines ont dû être concentrées.

Ces auteurs ont noté également une fréquente protéinurie banale associée, mais ils soulignent qu'une protéinurie importante est le plus souvent due uniquement ou de manière prédominante à la protéine de B.-J.

Par comparaison avec la méthode classique de précipitation par la chaleur, on peut noter que :

— tantôt la protéine de B.-J. paraît absente par cette méthode, alors que la technique immunochimique la montre abondante, ce qui dénote l'absence du critère habituel de précipitation à 56° C ;

— tantôt la protéine de B.-J. existe, mais paraît quantitativement faible par rapport aux protéines banales. Or l'immunochimie ou l'électrophorèse montrent la présence exclusive ou quasi exclusive de protéine de B.-J. Il faut donc penser que la plus grande partie de celle-ci n'a pas précipité à 56° C ;

— tantôt enfin une protéinurie faible paraît due uniquement à la protéine de B.-J. alors que la précipitation spécifique révèle la présence de sérumalbumine ou d'autres protéines réalisant donc une protéinurie complexe, pour le dépistage de laquelle, la méthode classique paraît, encore une fois, insuffisamment sensible.

De toute façon, si l'on voit que la méthode thermique peut pécher par défaut, l'on voit aussi qu'elle n'indique jamais à tort la présence de protéine de B.-J., et qu'elle doit faire prendre en considération même de très faibles traces de précipité.

La méthode d'Ouchterlony reste donc la méthode la plus sûre mais elle nécessite des immunsérums convenables, particulièrement riches en anticorps γ, ce qui n'est malheureusement pas toujours le cas pour les antisérums commercialisés.

3) Le problème de la spécificité des protéines de B.-J.

Pendant longtemps toute protéinurie de B.-J. a été considérée comme pathognomonique du myélome multiple des os. Collier (60) admit sa spécificité diagnostique.

Cependant, Hektoen et Welker (159) avaient noté qu'elle pouvait exister dans l'urine de cancéreux, Harvier et Rangier (154) l'avaient signalée chez les leucosiques et Burtin et coll. (45) ont reconnu six fois sa présence, le plus souvent à l'état de traces, dans les urines de huit malades atteints de cancer secondaire des os.

De même, ils l'ont décelée dans les urines de cirrhoses, d'une réticulose maligne, d'un sarcome d'Ewing et d'une dysglobulinémie hémorragipare.

Il semble donc que la présence de traces de protéine présentant certains des caractères de la protéine de B.-J. n'ait pas une valeur diagnostique formelle.

Par contre, il n'en reste pas moins qu'une protéinurie de B.-J. importante est très en faveur du diagnostic de myélome multiple des os.

En résumé, les protéines de B.-J. ont donc du point de vue immunologique les caractéristiques suivantes :

— elles possèdent chacune un déterminant antigénique appartenant à la mosaïque γ normale,

— ce déterminant peut varier d'une protéine à l'autre, expliquant les difficultés de révélation avec un antisérum humain normal,

— il existe en plus des déterminants spécifiques pour chaque protéine de B.-J. ; ces molécules sont donc différentes d'un malade à l'autre,

— les paraprotéines sériques étant elles-mêmes antigéniquement incomplètes, il est difficile d'établir leurs relations immunologiques avec des protéines de B.-J.,

— la détection immunologique est le procédé le plus sûr pour la mise en évidence de la protéinurie de B.-J. Elle est cependant délicate car tous les antisérums ne la révèlent pas,

— bien que non pathognomonique du myélome plasmocytaire, la protéinurie de B.-J. reste cependant très évocatrice de maladie de Kahler.

D) PROBLEMES PHYSIOPATHOLOGIQUES

1) Origine des protéines de B.-J.

Les théories visant à préciser l'origine des protéines de B.-J. ont été fort nombreuses, et l'on a successivement admis une origine rénale, osseuse, nutritionnelle, tumorale, virale et plasmocytaire.

De même ont été opposées, à propos de ces protéines urinaires et des paraprotéines sériques, les théories uniciste, dans laquelle les premières dérivaient des secondes par fragmentation et dualiste où les deux types protéiques étaient d'emblée présents.

a) *La théorie rénale*, qui admettait que la protéine de B.-J. résultait de la dégradation, au niveau du rein, des globulines en excès dans l'organisme et en particulier dans le plasma, est aujourd'hui abandonnée.

b) *La théorie osseuse* voulait expliquer la protéinurie comme le résultat de l'élimination des protéines de l'os, détruites par les enzymes des cellules tumorales et leucocytaires.

Cependant nous avons vu que la composition en amino-acides de l'osséine est très différente de celle des protéines de B.-J. en particulier pour le glycocolle, présent en grande quantité dans l'osséine, la tyrosine, la cystéine et le tryptophanne rencontrés en proportion notable dans la protéine myélomateuse. Ceci exclut donc toute filiation.

Rosenblom, en 1917, a émis l'hypothèse qu'une protéine particulière de l'os, l'« osséoalbumine », pouvait être à l'origine des protéines de B.-J. Elle serait hydrolysée par les enzymes tumoraux et éliminée sous forme de produit dégradé. Cet auteur aurait d'ailleurs

noté, au cours d'hydrolyse par la pepsine de cette protéine osseuse, l'apparition de produits coagulant à la chaleur et se redissolvant à l'ébullition. Cette expérience n'a, semble-t-il, pas été refaite et l'hypothèse n'explique pas l'hyperglobulinémie de la maladie de Kahler ; elle ne rend pas compte, également, de l'importance de certaines protéinuries de B.-J. en l'absence de grosses lésions radiologiques du squelette ; il est en effet difficile d'admettre que les protéines osseuses puissent disparaître sans entraîner des remaniements squelettiques considérables.

c) *La théorie tumorale*, fort ancienne, supposait que la protéinurie résultait de la dégradation et de l'élimination des protéines des tumeurs osseuses elles-mêmes. Cependant certains malades présentent une forte protéinurie de B.-J. sans qu'on observe chez eux de tumeurs osseuses et inversement de multiples foyers osseux peuvent ne pas s'accompagner d'une élimination urinaire notable.

d) *L'origine nutritionnelle*, proposée par Magnus-Levy, voyait dans la protéine de B.-J., le résultat d'une déviation du métabolisme général des protéines.

La méthode des bilans met effectivement en évidence un rapport entre l'ingestion azotée et l'excrétion de protéine de B.-J. Il semble d'ailleurs normal de penser qu'un large apport alimentaire d'acides aminés facilite la synthèse protéique et en particulier la synthèse de protéine de B.-J.

e) *Théorie plasmocytaire.* - Admise par tous les auteurs pour l'hyperglobulinémie, cette théorie l'est aussi pour la protéinurie de B.-J.

L'hypothèse d'une scission des protéines sériques anormales étant complètement exclue, on pense actuellement que la synthèse de la protéine de B.-J. se fait dans les plasmocytes au dépens du « pool » métabolique de l'azote des acides aminés et indépendamment d'un précurseur d'origine sérique. Cette protéine est synthétisée « de novo » et excrétée presqu'aussi rapidement qu'elle est formée.

L'origine plasmocytaire est bien établie par les travaux de Meyer (221) qui a montré l'incorporation de lysine ^{14}C dans la protéine de B.-J. obtenue par culture de moelle osseuse myélomateuse.

Les travaux de Putnam et Hardy (295), Hardy et Putnam (150) s'opposent aussi à la conception sérique de l'origine des protéines de B.-J.

2) Etudes isotopiques sur la synthèse et l'excrétion des protéines de B.-J.

Les auteurs précédents, faisant ingérer à des myélomateux du glycocolle marqué par ^{13}C ou ^{15}N, ont montré, par dosage de ces isotopes lourds, que les demi-vies de la protéine sérique et de la protéine de B.-J. isolées étaient très différentes, ce qui laisse penser que leurs biosynthèses sont absolument indépendantes.

Ainsi dans l'expérience n° 2 (150), la diminution de ^{15}N du glycocolle de la protéine de B.-J. est parallèle à celle de ^{15}N de l'urée,

de l'ammoniaque et de l'azote urinaire total, tandis que la teneur isotopique du glycocolle de la protéine sérique évolue tout à fait différemment, en baissant beaucoup plus lentement.

Des expériences identiques ont été faites avec de l'acide aspartique ^{15}N (Osserman et coll.) (256), de l'acide glutamique (Putnam et Miyake) (300) (303) et de la lysine (Putnam, Meyer et Miyake) (303), marqués par ^{14}C.

Des travaux analogues ont été réalisés enfin sur la souris présentant une tumeur plasmocytaire transplantable avec du glycocolle, de la valine et de la leucine marqués par ^{14}C (Askonas) (15).

Ces études isotopiques de l'école de Putnam, celles de Warter et coll. (375) ont révélé la remarquable rapidité de synthèse et d'élimination de la protéine de B.-J.

a) *Excrétion.*

On peut noter, comme le fait Putnam (306) que, lorsque du glycocolle-^{15}N ou du glycocolle 1-^{13}C est administré par voie buccale, la baisse des taux d'azote ou de carbone lourds urinaires est le plus souvent exponentielle durant la première semaine ; ensuite le taux d'isotopes tombe plus lentement, probablement en raison de l'incorporation des molécules marquées dans le pool azoté, et la rapidité de dégradation des protéines marquées est donc affectée par la réutilisation des acides aminés marqués.

La durée de demi-vie, pour la première partie de la courbe, est, pour un malade de 18 heures, de 43 pour un autre, lorsque l'aminoacide marqué est absorbé sur une période de 8 heures.

Dans l'expérience de Osserman et coll. (256), avec une prise orale unique d'acide aspartique marqué, la durée de demi-vie a été de 8 heures, et elle reste également entre 8 et 15 heures, suivant l'acide aminé traceur employé, lorsque l'on utilise pour l'introduction la voie intraveineuse.

La synthèse est donc rapide, la protéine de B.-J. passe dans le sang, comme le montre l'existence possible d'une protéinémie de B.-J. marquée (Morton et Deutsch) (232), puis elle est éliminée ensuite par le rein dans les 12 heures.

Autrement dit, elle ne participe pas au processus de renouvellement permanent comme le font les protéines sériques, mais suit le devenir des produits de déchets azotés, de faible poids moléculaire.

D'ailleurs, si l'on réinjecte une protéine de B.-J. biosynthétiquement marquée à un malade ou à des lapins, le taux isotopique sérique diminue dès la première demi-heure, et la majeure partie de l'isotope est retrouvée dans l'urine en quelques heures.

b) *Synthèse.*

Après injection intraveineuse d'un acide aminé traceur (acide glutamique 1-C^{14} (Putnam, Miyake et Meyer) (303), un intervalle de temps d'environ 40 minutes est observé avant que n'apparaisse une protéine marquée dans l'urine.

Un tel délai, intitulé « temps de transit » et observé d'abord pour la synthèse des protéines sériques normales, est constaté également

pour les protéines myélomateuses. Il représente la somme du temps requis pour la synthèse protéique et du temps nécessaire au passage des protéines depuis les lieux de synthèse jusque dans la circulation générale. Pour la protéine de B.-J. doit aussi être ajouté le temps d'excrétion. Il semble d'ailleurs, à ce sujet, que le facteur limitant l'apparition de la protéine dans l'urine ne soit pas la clearance rénale mais plutôt le temps de biosynthèse lui-même.

La rapidité d'excrétion d'une protéine de B.-J. marquée par administration d'acides aminés isotopiques est donc une preuve convaincante de la synthèse directe et non d'une dégradation de globulines sériques anormales. L'observation des courbes de radio-activité en fonction du temps pour la protéine de B.-J. et la paraprotéine sérique permet de dégager ainsi certains faits :

— 4 à 5 heures après l'injection unique d'acide glutamique marqué au carbone radioactif, la radioactivité de la protéine de B.-J. est rapidement maximum, après le « temps de transit ». Elle baisse ensuite assez vite alors que la radioactivité de la protéine sérique s'élève plus lentement, reste plus longtemps à son maximum avant de décroître doucement. La protéine sérique ne représente donc certainement pas un précurseur de la protéine urinaire, puisque sa synthèse s'accomplit plus lentement.

De même en utilisant des globulines myélomateuses marquées à ^{131}I et en les injectant à un autre malade, ayant une protéinurie de B.-J. sans nette anomalie sérique, Berson et Yalow (27) ont pu montrer que la protéine urinaire ne contenait pratiquement pas d'^{131}I.

Inversement, la protéine de B.-J. est-elle un précurseur des paraprotéines sériques ? Les courbes de radioactivité permettraient évidemment de le supposer mais elles n'autorisent pas cependant à affirmer que les globulines myélomateuses sont élaborées directement, soit à partir des acides aminés, soit à partir d'un intermédiaire commun à la protéine de B.-J.

Car si les études isotopiques éliminent tout passage des paraprotéines aux protéines de B.-J. et réciproquement semble-t-il, dans le milieu extracellulaire, elles n'apportent guère de renseignements sur le métabolisme intraplasmocytaire.

Il n'est donc pas toujours exclu de penser qu'à l'intérieur des cellules tumorales, les deux types de protéines peuvent se former indépendamment ou se transformer l'un en l'autre par passage direct ou par addition d'acides aminés libres à un précurseur préformé, représentant un maillon dénaturé de la synthèse normale des γ-globulines.

Ceci illustre, encore une fois, le problème difficile des rapports entre protéines de Bence-Jones et globulines myélomateuses sériques.

En résumé, les protéines de B.-J. restent très caractéristiques du myélome multiple.

Lorsqu'elles sont recherchées par coagulation par la chaleur et thermosolubilité, elles ne sont décelées que dans un nombre assez limité de cas, mais les techniques électrophorétiques et immunologiques, plus précises et plus délicates, permettent de conclure à leur existence constante.

Il s'agit souvent d'une protéinurie pure, homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse, migrant alors avec une vitesse voisine de celle des β- ou des γ-globulines ; sa constante de sédimentation se situe entre 3,1 et 3,6 S et son poids moléculaire est faible, oscillant autour de 45 000, ce qui explique l'élimination urinaire facile.

La composition en acides aminés est caractérisée par la richesse en hydroxyamino-acides et par un taux variable mais toujours faible de méthionine.

Immunologiquement, elles sont reliées aux γ-globulines dont elles possèdent l'un des déterminants antigéniques.

Synthétisées rapidement par les plasmocytes anormaux, ces protéines ont une existence éphémère dans le sérum et sont éliminées dans l'urine.

Le problème de leur biosynthèse fait intervenir la synthèse directe à partir d'amino-acides, ou bien la synthèse à partir d'un précurseur commun aux globulines myélomateuses sériques, représentant peut-être un chaînon structural altéré de la synthèse des γ-globulines. En aucun cas cependant, les protéines de B.-J. ne peuvent être considérées comme des produits de dégradation des paraprotéines sériques.

CHAPITRE III

Rapports entre syndromes clinique et biochimique.

Au terme de cette étude, dans laquelle nous avons essayé de résumer les données actuelles de la biochimie du myélome multiple, on s'aperçoit facilement que de nombreuses questions restent à résoudre, à la fois sur le plan théorique et sur le plan pratique.

Ainsi, par exemple, y a-t-il *une corrélation entre les perturbations protéiques et le syndrome clinique* ?

Le trouble protéique, la dysprotéinémie, n'apparaît certainement pas comme un simple témoin de la maladie, un signe humoral quelconque. C'est un des éléments du processus morbide et de sa présence découle vraisemblablement un certain nombre de signes :

— *Les hémorragies.* - Elles se rencontrent assez souvent dans les dysglobulinémies caractérisées par des éruptions purpuriques et des saignements des muqueuses.

Ces troubles peuvent dépendre certes d'une thrombopénie liée à l'envahissement néoplasique de la moelle, mais ils peuvent aussi être liés à la paraprotéinémie elle-même ; le mécanisme serait peut-être analogue à celui observé lors de l'injection intra-veineuse de macromolécules synthétiques.

Les auteurs incriminent tantôt un déficit en calcium plasmatique, lié à la protéine, d'où le trouble dans la transformation du fibrinogène, tantôt un trouble de l'adhésivité des plaquettes, tantôt enfin un trouble capillaire lié peut-être à des dépôts paraprotéiques sur leur paroi ou à une hyperviscosité sanguine.

Toutefois ces diverses notions sont sans doute beaucoup plus réelles dans la maladie de Waldenstrôm que dans le myélome multiple.

— *Les manifestations rénales.* - A côté de la protéinurie de B.-J., une protéinurie banale est très souvent observée.

Dès lors, deux questions peuvent se poser :

- La dysprotéinémie intervient-elle dans les lésions rénales ?

- la protéine de B.-J. elle-même a-t-elle une action locale, rénale ?

— La dysprotéinémie peut intervenir, nous venons de le dire, par son action sur les parois capillaires, action toxique ou action mécanique de thrombose dont le floculus va subir les effets, comme le démontrent les altérations microscopiques du glomérule.

Il peut également exister une sclérose vasculaire ou interstitielle banale, une amylose ou une infiltration du parenchyme rénal par des

plasmocytes mais la dysprotéinémie semble cependant jouer un rôle primordial, à tel point que toute dysglobulinémie majeure a les plus grandes chances de s'accompagner en dehors de la protéinurie de B.-J., d'une protéinurie classique faite d'albumine et de protéines diverses comme le montre l'électrophorèse.

— Quant à la protéine de B.-J., elle a longtemps été considérée comme responsable des lésions du rein myélomateux.

On peut voir effectivement des précipitations cristallines dans les cellules des tubes rénaux, ressemblant à celles obtenues *in vitro* avec la protéine de B.-J.

De même une action toxique directe sur les tubes a été invoquée mais l'hypothèse ne tient guère si l'on sait que les insuffisances rénales majeures ont été observées souvent lorsqu'il n'y avait pas de protéinurie de B.-J. importante.

De plus les lésions sont essentiellement glomérulaires et la dysglobulinémie semble plus nocive que la protéine de B.-J. elle-même.

— *Le déficit immunitaire.* - Comme le montrent l'électrophorèse, la chromatographie et l'immunoélectrophorèse, les γ-globulines normales sont très nettement diminuées, voire absentes, à côté de la paraprotéinémie.

Celle-ci étant liée à une déviation de la synthèse normale des γ-globulines, on conçoit que celles-ci et donc les anticorps, soit très abaissés.

Ainsi s'explique la sensibilité particulière des Kahlériens aux infections banales, en particulier broncho-pulmonaires et urinaires, rapprochant ces malades des syndromes hypo- ou agammaglobuliniques constitutionnels ou acquis.

Y a-t-il également un rapport entre le syndrome biochimique, l'évolution et le pronostic de la maladie ?

Alors que les données cytologiques ont souvent une valeur pronostique, fondées sur la plus ou moins grande richesse du médullogramme en cellules plasmocytaires, sur les caractères d'immaturité et de monstruosité de ces cellules, les éléments du syndrome biochimique, par contre, semblent n'avoir guère de valeur.

Ainsi, l'importance de l'hyperglobulinémie, de la protéinurie de B.-J. n'ont aucun rapport avec la rapidité d'évolution.

Le type électrophorétique et immunologique aurait peut-être un peu plus de valeur, les α- et β-myélomes ayant, pour certains auteurs, un caractère évolutif plus sévère que les γ-myélomes. Cela reste cependant très imprécis.

Telles sont les relations assez nettes entre la dysglobulinémie et certaines manifestations cliniques. Il en existe certainement beaucoup d'autres qui nous échappent encore car tout le métabolisme protéique est perturbé par la synthèse des paraprotéines.

La rapidité d'absorption intestinale d'acides aminés comme le glycocolle marqué au ^{14}C et la méthionine, a montré en effet à Warter et coll. (375) que les myélomateux se comportaient comme des sujets en état de carence protéique chronique, avides d'aminoacides, ceux-ci étant aussitôt déviés vers la synthèse anarchique

plasmocytaire et souvent éliminés rapidement sous forme de protéine de B.-J.

En conclusion, la maladie de Kahler nous apparaît donc aujourd'hui comme une véritable maladie métabolique, et peut-être même moléculaire puisque le fond du problème de la synthèse anarchique des paraprotéines pourrait être une simple perturbation dans la séquence en amino-acides d'un chaînon précurseur de γ-globulines. Le fait serait alors comparable à celui des hémoglobines pathologiques, où, par exemple, la seule différence entre l'hémoglobine adulte (Hb A) et l'hémoglobine B des drépanocytaires est le remplacement d'un résidu d'acide glutamique par un résidu de valine. Ici, cependant, la perturbation protéique est acquise et non transmissible et il est en définitive impossible d'affirmer qu'il s'agit d'une véritable maladie moléculaire.

Car, étant donné la grande hétérogénéité de la famille des γ-globulines, il n'est pas exclu que la paraprotéinémie soit due à l'élévation sélective et anarchique d'une seule des espèces constitutives de ce groupe.

Pour essayer d'individualiser au mieux cette paraprotéine on peut seulement la définir ainsi, avec Kempf (186) :

« — C'est une protéine élaborée entièrement et avec sa constitution définitive par l'organisme hôte (ce qui la distingue d'une protéine d'origine étrangère et d'une protéine dégradée ou modifiée).

— Elle possède une constitution chimique qui diffère de celle des protéines normales de l'organisme mais l'anomalie de structure est suffisamment limitée pour qu'on puisse encore rattacher cette protéine à un type déterminé.

— L'anomalie de structure porte fondamentalement sur la séquence polypeptidique c'est-à-dire sur la structure primaire de la protéine.

— Une telle anomalie peut être attribuée à une perturbation apparemment acquise, par mutation, du mécanisme de biosynthèse des γ-globulines. »

Nos connaissances étio-pathogéniques restent donc encore très incomplètes bien que les résultats du désordre biochimique nous soient maintenant assez familiers pour pouvoir appuyer ou orienter la clinique vers le diagnostic de myélome multiple des os.

Ce diagnostic biologique se pose dans des circonstances très diverses et il repose sur divers éléments que nous résumerons brièvement :

— *l'hyperprotéinémie* est très fréquente, mais le taux des protides est parfois normal ou subnormal ;

— *la protéinurie de B.-J.* est assez rarement mise en évidence exclusivement par son caractère de thermosolubilité ; une protéinurie massive constitue un bon indice en faveur de sa présence.

Par contre, elle est très fréquemment mise en évidence par électrophorèse des urines concentrées et constamment trouvée par les techniques immunologiques.

Elle peut être pure ou associée à une élimination non négligeable de sérum-albumine.

Enfin un certain balancement semble exister entre les fortes protéinuries de B.-J. et les protéinémies normales ou subnormales.

— *En électrophorèse et immunoélectrophorèse :*

- les anomalies γ sont les plus fréquentes. Elles ne touchent que le groupe des γ-globulines 7 S ;
- les anomalies β se rattachent immunologiquement au groupe β_{2a} ;
- les anomalies α_2 sont exceptionnelles et peuvent d'ailleurs être rattachées à un groupe β rapide.

La constatation d'une anomalie protéique sur le diagramme est très fréquemment associée à une protéinurie de B.-J., mais aussi il n'est pas exceptionnel d'observer un diagramme normal avec une protéine de B.-J. décelée par électrophorèse des urines concentrées ou par immunologie.

— Dans certains cas enfin, les électrophorèses de zone sur papier ou en gélose sont muettes et seule l'immunoélectrophorèse permet de trouver une anomalie.

TROISIÈME PARTIE

Recherches personnelles

Dans la somme considérable de travaux consacrés aux protéines myélomateuses, la question de leur hydrolyse enzymatique et l'étude des peptides libérés, ont été sans doute moins abordés.

On se heurte en effet rapidement à des problèmes de structure encore insurmontables du fait des dimensions et du poids moléculaire des protéines myélomateuses sériques d'une part, le nombre des peptides obtenus après hydrolyse d'autre part.

Les travaux de l'école de Putnam, aux Etats-Unis, ont cependant déjà bien étendu nos connaissances sur les divers peptides issus de l'hydrolyse enzymatique. Mais les fractionnements ont été réalisés après hydrolyse papaïnique ou trypsique et il nous a paru intéressant de voir le mode d'action d'autres enzymes protéolytiques, tels que pepsine et chymotrypsine, sur ces substrats.

De même l'étude immunologique des hydrolysats de protéines myélomateuses n'est guère avancée alors que pour les γ-globulines normales, les faits sont beaucoup mieux connus.

Ce sont donc ces expériences d'hydrolyses enzymatiques des protéines myélomateuses, avec séparation et étude immunologique des produits formés, que nous avons essayé d'envisager, à partir de 15 observations que nous allons d'abord sommairement résumer.

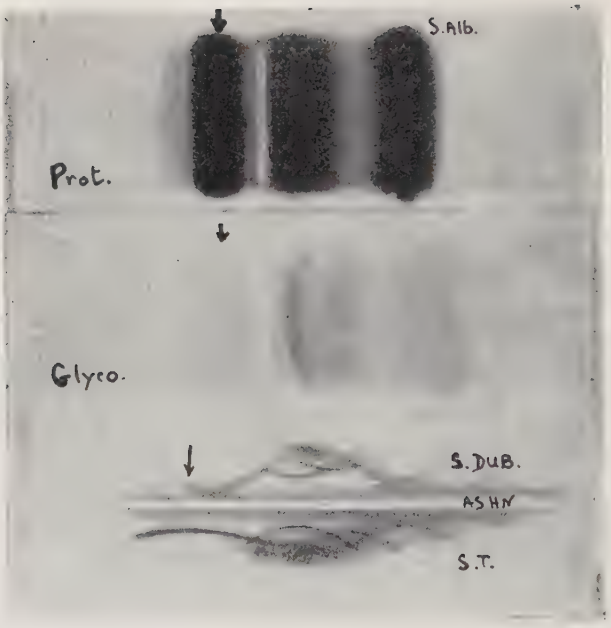


FIGURE 6. — Electrophorèse en gélose (protéinogramme coloré au vert de Lissamine, glycoprotéinogramme coloré au P.A.S.) et immunoélectrophorèse de l'observation 1. S.T. : sérum témoin ; ASHN : antisérum humain normal de l'Institut Pasteur.

CHAPITRE PREMIER

Présentation des observations.

Les « substrats » protéiques que nous avons pu utiliser, proviennent du sérum ou de l'urine de 15 malades présentant un myélome plasmocytaire plus ou moins typique sur le plan clinique.

Ces observations, quoique résumées, nous permettront de voir dans quelles conditions le diagnostic a pu être établi.

Observation N° 1

M. DUB..., 48 ans.

— Pas d'antécédents particuliers.

— En janvier 1961, bronchite, état grippal suivis d'une asthénie et d'un amaigrissement très importants.

— En mars 1961, hospitalisation dans le service de Médecine Ouest (Pr. Warembourg) Lille.

— L'examen clinique est normal.

— L'examen radiologique complet du squelette ne révèle rien.

— Les résultats biologiques sont les suivants :

V.S. : 30/66 (*)

Numération - Formule : 5 000 00 GR - 7 200 GB.

Protéines totales : 75 g p. 1 000.

Electrophorèse :	Albumine		40,2 %,
	Globulines	α_1	3,4 %,
	»	α_2	9,5 %,
	»	β	8,9 %,
	»	γ	38 %.

Médullogramme : 15 % de plasmocytes.

L'immunoélectrophorèse révèle une anomalie nette des γ-globulines, de type Kahlérien :

(*) La V.S. a toujours été déterminée par la méthode de Fuente-Hita sauf dans les cas où la technique de Westergreen est précisée.

Observation N° 2

M. BAR..., 73 ans.

— Début de la maladie en juin 1961 par des douleurs thoraciques sous-mamelonnaires gauches ayant assez rapidement cédé.

— En juillet, douleurs lombosacrées avec irradiation crurale et atteinte de l'état général.

— Hospitalisé en Médecine Nord (service du Professeur Mériel) le 2 août 1961.

L'examen clinique est pauvre.

Les radiographies du crâne montrent de petites lacunes disséminées ; celles du thorax une petite tumeur sur l'arc de la 6e côte gauche au niveau de la ligne axillaire.

— Les examens biologiques sont les suivants :

V.S. : 161/163.

Formule et numération : 2 600 000 hématies - 3 000 leucocytes avec 69 % de polynucléaires.

Protéines totales : 82 g p. 1 000.

Electrophorèse (4 août 1961) :

Albumine		38,8 %,
Globulines	α_1	3,2 %,
»	α_2	5,6 %,
»	β	8,3 %,
»	γ	44,1 %.

L'immunoélectrophorèse est très typique.

Le médullogramme montre 44 % de plasmocytes, le 15/10/61.

Dans les urines, il y a une importante protéinurie oscillant entre 25 et 30 g p. 1 000.

Electrophorèse et immunoélectrophorèse montrent la présence d'une protéine anormale presque pure.

La recherche thermique de la protéine de Bence-Jones est très positive confirmant le diagnostic de maladie de Kahler.

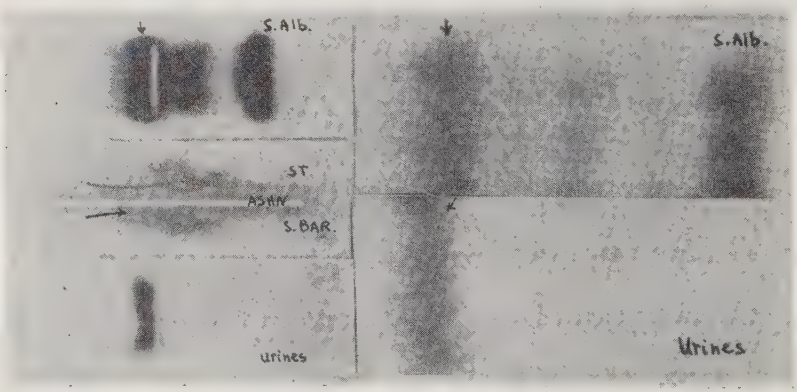


Figure 7. — Electrophorèse en gélose et sur papier du sérum et des urines, immunoélectrophorèse du sérum de l'observation 2.

Observation N° 3

Mme LAS..., 71 ans.

— En janvier 1961, apparition de lombalgies associées à des douleurs radiculaires dorsales (D5 - D6). Amaigrissement et anorexie.

— Hospitalisation dans le service d'Urologie pour bilan ; transfert en Médecine Nord en août 1961, à la suite de la découverte d'une albuminurie et d'une hyperprotéinémie à 120 g p. 1 000.

— Cliniquement, l'état général est médiocre, les douleurs lombaires, dorsales, sternales (fracture spontanée du sternum) sont importantes.

L'examen révèle peu de choses en dehors d'une cypho-scoliose et d'un souffle systolique de la pointe.

— Radiologiquement, le crâne est percé d'innombrables lacunes, la colonne dorsale déminéralisée dans son ensemble avec effondrement et cunéisation de D5, L1 et L2 ; des fractures sont décelées au niveau des côtes et du sternum.

— Biologiquement : la V.S. est à 60/66 ; les protéines totales à 120 g, puis 90 g p. 1 000.

L'électrophorèse donne :

Albumine		34,3 %,
Globulines	α_1	2,6 %,
»	α_2	7,6 %,
»	β	4,4 %,
»	γ	51,1 %.

La moelle sternale montre 23 % de plasmocytes dont le cytoplasme renferme des cristaux.

Dans les urines : la protéinurie varie entre 1 et 14 g p. 1000 ; la présence de protéine de Bence-Jones est constante.

— L'évolution est rapide, et à l'occasion d'une phlébite une embolie pulmonaire massive emporte cette malade dont la nécropsie a confirmé le diagnostic de myélome plasmocytaire, particulièrement typique cliniquement et biologiquement.

FIGURE 8. — Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse du sérum (obs. n° 3). (2) : sérum non dilué ; (3) : sérum dilué au 1/2 ; (4) : sérum dilué au 1/4.

Observation N° 4.

M. CAB..., 62 ans.

— Pas d'antécédents notables en dehors de l'exposition aux rayons X au cours de graphies digestives ou de radioscopies.

— En 1959, asthénie et dyspnée d'effort. Le bilan biologique montre à cette époque, une anémie, une leuconeutropénie avec thrombopénie. La moelle sternale est pauvre sans réaction érythroblastique.

L'électrophorèse montre une hyper γ-globulinémie à 36,7 %.

— En octobre 1960, l'asthénie augmente et le malade cesse toute activité.

Il y a alors :

1 845 000 GR et 2 680 GB - protéines totales 90,2 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		41,4 %,
Globulines	α_1	2,1 %,
»	α_2	4,7 %,
»	β	6,8 %,
»	γ	45,0 %.

— En novembre 1961, hospitalisé dans le service de Médecine Sud (Professeur Gadrat) pour épistaxis, purpura généralisé, pétéchial et ecchymotique ; l'examen clinique est sensiblement normal.

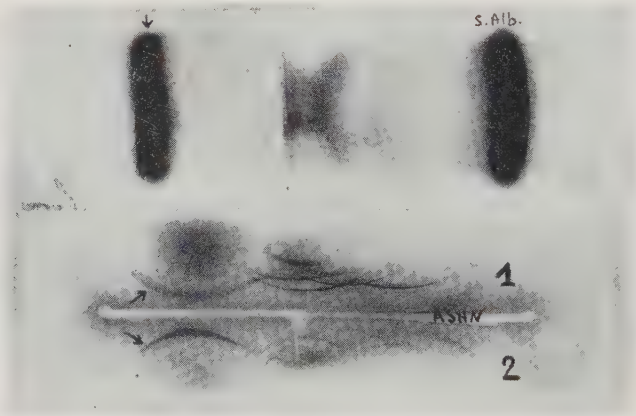


Figure 9. — Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse du sérum non dilué (1) et dilué au 1/4 (2). Observation n° 4.

Les radiographies osseuses montrent quelques lacunes craniennes.

Numération et formule : 2 600 000 GR - 9 000 GB avec 38 % de polynucléaires.

Protéines totales : 65 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		42,0 %,
Globulines	α_1	10,6 %,
»	α_2	6,0 %,
»	β	14,2 %,
»	γ	27,2 %.

Moelle sternale pauvre sans plasmocytose.

Pas de protéinurie de Bence-Jones.

— L'immunoélectrophorèse révèle un arc de type myélomateux en zone γ.

Sur ces données, sur celles de l'électrophorèse et des radiographies craniennes, le diagnostic de maladie de Kahler est donc le plus vraisemblable, bien que la nette régression de la dysprotéinémie ne soit pas classique, malgré un long traitement cortisonique.

Observation N° 5.

M. RAIL..., 70 ans.

— En juillet 1960, pneumopathie fébrile accompagnée de violentes douleurs interscapulaires.

— En septembre 1960 découverte d'une tumeur costale fusiforme, au niveau de la 9e côte, sur la ligne axillaire postérieure ; d'un effondrement complet, en galette, de la 4e vertèbre dorsale.

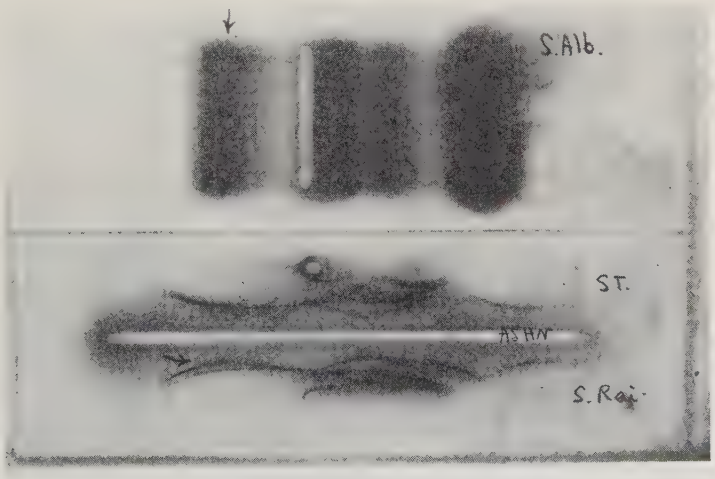


Figure 10. — Observation n° 5 : Electrophorèse et immunoélectrophorèse sériques.

— En octobre 1960, hospitalisation en Médecine Nord (service du Professeur Mériel). Une biopsie de la tumeur costale montre une infiltration en nappe de plasmocytes. L'immunoélectrophorèse révèle une protéine anormale de type Kahlérien et le diagnostic de myélome plasmocytaire est porté, bien qu'il n'existe pas de perturbation

majeure à l'électrophorèse, pas de protéinurie de Bence-Jones. pas d'accélération de la vitesse de sédimentation globulaire : 7/12, pas d'anémie ni d'autres atteintes radiologiques du squelette.

— En décembre 1960, apparition d'un syndrome pyramidal fruste du côté gauche. La V.S. reste toujours normale à 4/9.

— En mars 1961, apparition d'un syndrome pyramidal bilatéral, mais les phénomènes fonctionnels restent toujours assez discrets et le bilan biologique satisfaisant :

V.S. : 14/24.

Protéines totales : 66 g p. 1 000.

Numération et formule : Hématies 4 900 000 - Leucocytes 9 500 dont 60 % de polynucléaires.

Electrophorèse :

Albumine		48,9 %,
Globulines	α_1	3,2 %,
»	α_2	9,2 %,
»	β	19,0 %,
»	γ	19,7 %.

— En février 1962, l'état général reste assez bon sous corticothérapie, la V.S. est à 17/21, et les images radiologiques pratiquement inchangées, sans que de nouveaux foyers soient apparus.

Protéines totales : 66 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		49,1 %,
Globulines	α_1	3,8 %,
»	α_2	11,7 %,
»	β	14,0 %,
»	γ	21,4 %.

Observation N° 6.

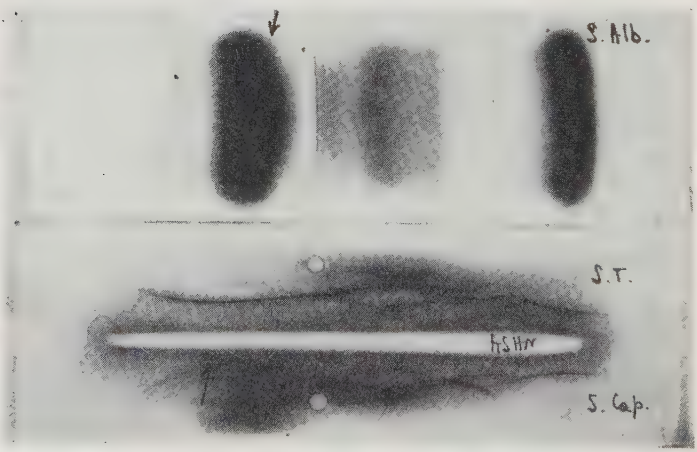


Figure 11. — Observation n° 6 : Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse sériques.

Mme CAP.... 60 ans.

— En février 1961, apparition de lombalgies.

— En septembre 1961, aux lombalgies s'ajoutent des douleurs dorsales avec irradiation en ceinture au niveau de D7 - D8 et des douleurs sternales et costales.

— En novembre 1961, hospitalisation dans le service de Médecine Nord. Cette malade présente un grand syndrome algique fait de douleurs thoraciques lombaires rendant l'examen difficile et entraînant une impotence complète.

Il n'y a pas de signes neurologiques.

— La radiographie de la colonne dorsale révèle un effondrement de D7. Il existe au niveau du crâne des images microlacunaires diffuses, ainsi que des lacunes costales, claviculaires et iliaques.

— Le bilan biologique est le suivant :

V.S. : 105/130 (Westergreen).

Numération - Formule : 4 250 000 hématies - 5 000 leucocytes avec 69 % de polynucléaires.

Urée sanguine : 0,60 g p. 1 000.

Protéines totales : 84 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		35,9 %,
Globulines	α_1	12,8 %,
»	α_2	9,8 %,
»	β	6,6 %,
»	γ	32,9 %.

Moelle sternale : 41 % de plasmocytes.

Albuminurie : 0,20 g p. 1 000.

Recherche de la protéinurie de Bence-Jones : négative.

Observation N° 7.

Mme BOR..., 57 ans.

— Antécédents : petits troubles moteurs avec gêne à la marche en 1950, accompagnés de douleurs lombaires. Le diagnostic de sclérose en plaques est un moment envisagé.

— En août 1961, douleurs dorso-lombaires et raideur du rachis. Un début de traitement corticoïde provoque une poussée hypertensive.

Bientôt apparaît un syndrome pyramidal des deux membres inférieurs avec rétention d'urine.

Le reste de l'examen clinique est normal.

— Les examens radiographiques ne révèlent rien, sauf peut-être quelques microlacunes crâniennes.

— Les examens biologiques sont les suivants :

V.S. : 67/70.

Urée sanguine : 1 g p. 1 000.

Protéines totales : 102 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		34,1 %,
Globulines	α_1	4,1 %,
»	α_2	4,8 %,
»	β	7,2 %,
»	γ	49,8 %.

Moelle sternale : 54 % de plasmocytes.

Albuminurie : 0,70 g p. 1 000.

Protéinurie de Bence-Jones : négative.

— L'évolution a été rapidement fatale puisque cette malade est décédée en décembre 1961 dans un état comateux.

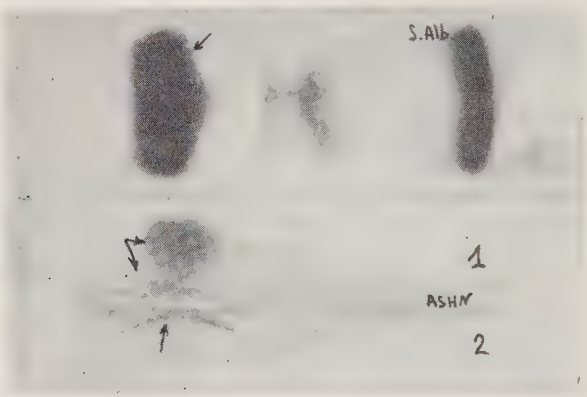


FIGURE 12. — Observation n° 7 : Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse du sérum non dilué (1), et dilué au 1/4 (2).

OBSERVATION N° 8.

M. DUT..., 72 ans.

— Antécédents : ulcus duodénal, maladie de Pick Alzheimer (atrophie corticale) développée depuis quelques années.

— En octobre 1961, apparition insidieuse d'une phlébite du membre inférieur gauche, indolore, dont la cause ne peut être précisée.

— En novembre 1961, hospitalisation en Médecine Sud (Professeur GADRAT).

— Malgré un état subfébrile persistant, l'état général est bien conservé.

— La recherche d'une néoplasie viscérale a été négative et l'exament clinique, en dehors des signes patents de phlébite, est normal.

Les radiographies du squelette ne décèlent rien.

— Examens biologiques :

V.S. : 97/107.

Protéines totales : 65 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		45,0 %,
Globulines	α_1	2,8 %,
»	α_2	10,7 %,
»	β	14,3 %,
»	γ	27,2 %.

L'immunoélectrophorèse montre une globuline anormale en région γ, de type Kahlérien.

C'est le diagnostic qui est retenu en définitive malgré l'absence de :

— plasmocytose médullaire ;
— protéinurie de B.-J. ;
— lésions radiologiques.

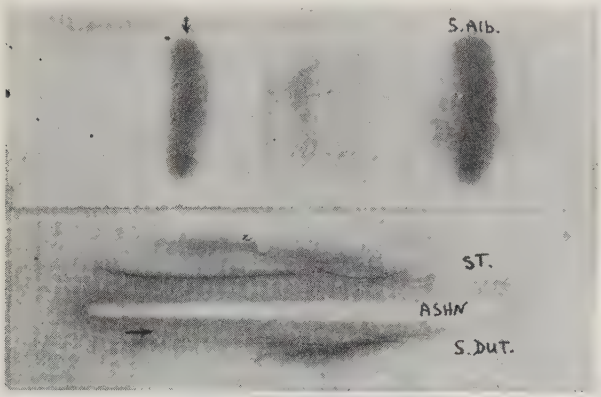


Figure 13. — Observation n° 8 : Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse du sérum.

Observation N° 9.

M. GAU..., 67 ans.

— Antécédents : scléro-emphysème et insuffisance coronarienne.

— En octobre 1961, apparition de lombalgies et d'une cruralgie gauche de type L3.

A peu près à la même date, discrète monoplégie brachiale gauche sans coma, ayant rapidement rétrocédé.

— Hospitalisation dans le service du Professeur Mériel, en décembre 1961.

Etat général médiocre, amaigrissement récent, accentuation des douleurs lombaires et crurales.

L'examen clinique est pauvre : pas de signes neurologiques, prostate sensiblement normale, T.A. 20/9.

— Sur le plan biologique :

Numération - Formule : 4 100 000 hématies - 9 500 leucocytes avec 66 % de polynucléaires.

Urée sanguine : 0,70 g p. 1 000.
Phosphatases acides : 9,5 unités Plumel.
Protéinurie de Bence-Jones : négative.
Mais surtout Protéines totales : 90 g p. 1 000.
Electrophorèse :

Albumine		35,5 %,
Globulines	α_1	6,0 %,
»	α_2	10,0 %
»	β	6,7 %,
»	γ	41,8 %.

V.S. : 107/147.
Moelle sternale : 45 % de plasmocytes.

L'immunoélectrophorèse confirme bien le diagnostic de myélome plasmocytaire, alors que les examens radiographiques sont strictement normaux hormis peut-être quelques microlacunes crâniennes.

— En janvier 1962, la dysprotéinémie s'accuse avec :
Protéines : 94 g p. 1 000.
Electrophorèse :

Albumine		34,6 %,
Globulines	α_1	7,8 %,
»	α_2	6,2 %,
»	β	5,8 %,
»	γ	45,6 %.

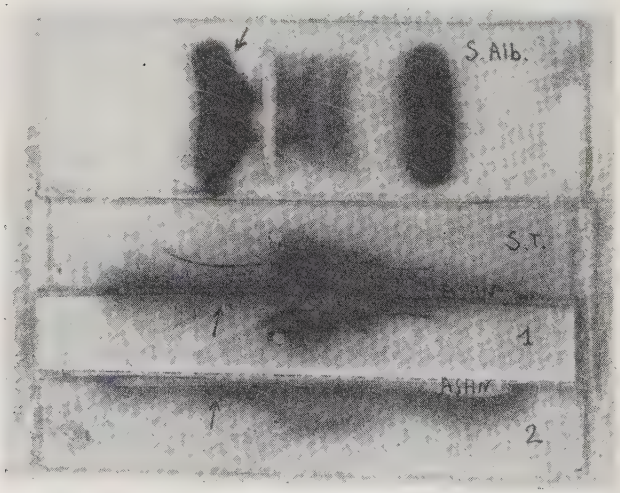


FIGURE 14. — Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse du sérum non dilué (1), et dilué au 1/4 (2). Observation n° 9.

Observation N° 10.

M. GER..., 68 ans.

— Antécédents : à l'âge de 15 ans, rhumatisme articulaire aigu probable.

— En octobre 1960, lombosciatique gauche, sans signes neurologiques, suivie d'une sciatique droite quelques semaines après.

— En mars 1961, douleurs polyarticulaires avec température, évoquant un rhumatisme streptococcique.

Rechute en mai 1961, hospitalisation en Médecine Sud (Professeur Gadrat).

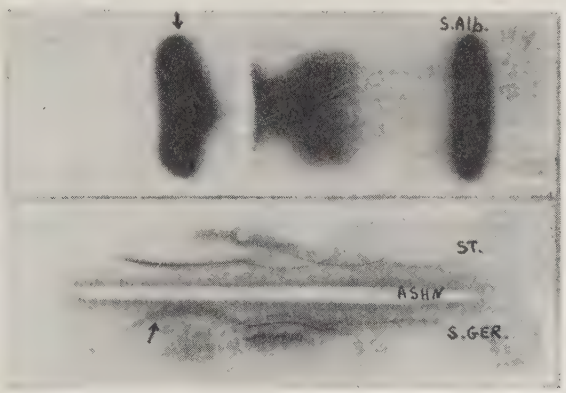


Figure 15. — Observation n° 10 : Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse du sérum.

Bon état général, température à 39° C, douleurs polyarticulaires diffuses avec quelques signes inflammatoires locaux.

Le reste de l'examen est normal.

— Examens radiologiques normaux.

Examens biologiques :

V.S. : 45/82.

Numération - Formule GR : 4 900 000 - GB : 16 400 avec 85 % de polynucléaires.

Bilan inflammatoire normal.

Protéines totales : 87 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		28,6 %,
Globulines	α_1	6,8 %,
»	α_2	14,3 %,
»	β	11,9 %,
»	γ	38,4 %.

L'immunoélectrophorèse révèle facilement une gamma-globuline anormale.

Moelle sternale : plasmocytes 37 % dont 29,2 % de plasmocytes atypiques.

Recherche de la protéinurie de Bence-Jones : négative.

Observation N° 11.

Mme PLA..., 62 ans.

— En novembre 1960, lombalgies et dorsalgies puis névralgie sciatique.

— En 1961, lente évolution. L'impotence devient pratiquement complète.

Des examens radiographiques montrent une ostéoporose vertébrale diffuse.

— Hospitalisation en janvier 1962 en Médecine Nord (Professeur Mériel).

Malade fatiguée, grabataire dont l'examen ne révèle rien en dehors d'une légère tachycardie, d'un tremblement fin des extrémités. Pas d'exophtalmie, pas de goitre.

Devant les images radiologiques, montrant une déminéralisation vertébrale diffuse très marquée et le tableau clinique, deux diagnostics sont à envisager :

— une carcinomatose rachidienne à point de départ peut-être thyroïdien,

— ou une maladie de Kahler.

— Bilan biologique.

V.S. : 126/140.

Numération - Formule : 3 800 000 GR - 6 000 GB avec 59 % de polynucléaires.

Protéines totales : 96 g p. 1 000.

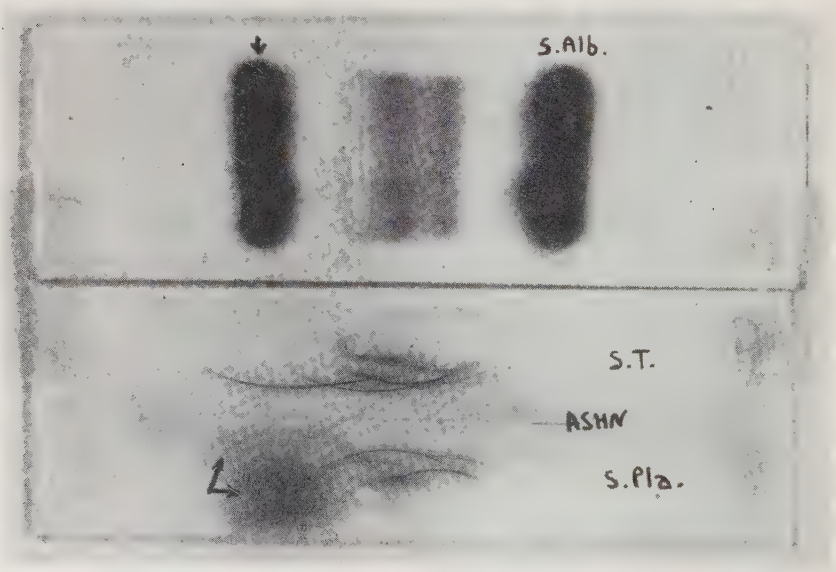


Figure 16. — Observation n° 11 : Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse sériques.

Electrophorèse :

Albumine		36,6 %,
Globulines	α_1	4,3 %,
»	α_2	14,7 %,
»	β	8,0 %,
»	γ	36,4 %.

L'immunoélectrophorèse montre une belle image de paraprotéine γ.

Moelle sternale : pas de plasmocytes mais 22 % d'érythroblastes.

Albuminurie : 0,15 à 0,35 g. pour 1 000.

Protéinurie de B.-J. : négative.

L'épreuve de fixation de l'^{131}I est normale et l'on s'oriente donc vers une myélomatose décalcifiante diffuse.

Observation N° 12.

Mme BAQ..., 59 ans.

— En septembre 1955, douleurs et enraidissement de la colonne cervicale, évoluant par poussées avec longues périodes de calme.

— En mars 1960, accentuation des signes fonctionnels après un léger trauma.

— En juillet 1961, hospitalisation dans le service du Professeur Mériel pour cervicarthrose.

On note alors une colonne cervicale raide, figée et douloureuse dans tous les mouvements et des paresthésies dans les deux membres supérieurs.

L'examen clinique est entièrement normal.

L'examen radiologique met en évidence des signes de cervicarthrose mais aussi une image suspecte au niveau de l'épineuse de C2, confirmée par tomographie. Sa nature tumorale est précisée dans le service de Neuro-Chirurgie (Professeur Lazorthes) où une ponction biopsie est pratiquée. L'examen histologique révèle un myélosarcome plasmocytaire.

Par ailleurs, le reste du bilan radiologique est normal.

V.S. : 25/31.

Numération - Formule : Hématies 5 000 000 - Leucocytes 5 500 dont 68 % de polynucléaires.

Protéines totales : 66 g pour 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		48,0 %,
Globulines	α_1	3,3 %,
»	α_2	13,4 %,
»	β	21,4 %,
»	γ	13,9 %.

Moelle sternale hypoplasique sans plasmocytose notable.

Protéinurie de B.-J. absente.

Le syndrome biologique est donc à peu près normal, mais l'immunoélectrophorèse est *très pathologique*, révélant une paraprotéine γ de type myélomateux.

On entreprend de la radiothérapie cervicale mais un syndrome de compression médullaire cervicale apparaît avec signes pyramidaux aux quatre membres et atrophie des mains.

Le décès est survenu rapidement.

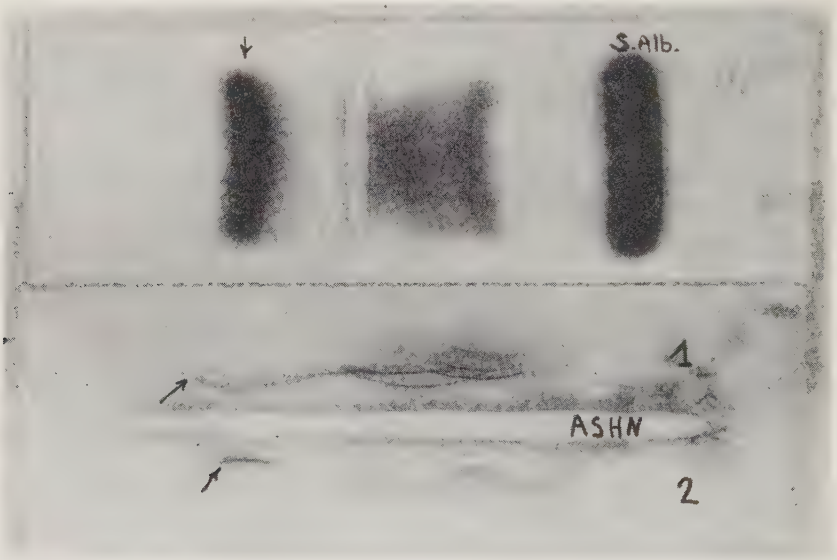


FIGURE 17. — Observation n° 12 : Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse du sérum non dilué (1), et dilué au 1/2 (2).

OBSERVATION N° 13.

M. VEY..., 63 ans.

— Antécédents coronariens depuis décembre 1958.

— En octobre 1961, ce malade est hospitalisé dans le service du Professeur MÉRIEL pour un épisode syncopal avec striction thoracique.

L'électrocardiogramme montre un bloc de branche droit et une ischémie sous-endocardique.

De plus, cet homme présente des douleurs sternales et costales et l'on remarque sur la voûte crânienne trois zones dépressibles.

L'asthénie est nette, mais l'état général est conservé, il n'y a pas d'amaigrissement.

On note également des œdèmes des membres inférieurs et une claudication intermittente avec des pouls périphériques non perçus.

— Les examens radiographiques montrent de multiples géodes crâniennes d'assez grande taille et une dilatation costale fusiforme au niveau de l'arc antérieur de la 5e côte droite. Le reste du squelette est normal.

— Les examens biologiques montrent :
V.S. 13/25.
Numération et formule 3 900 000 hématies - 6 500 leucocytes.
Urée sanguine : 0,20 g p. 1 000.
Protéines totales : 66 g p. 1 000.

Electrophorèse :	Albumine		63,5 %,
	Globulines	α_1	6,3 %,
	»	α_2	10,9 %,
	»	β	13,9 %,
	»	γ	5,4 %.

Albuminurie de 5 à 20 g p. 1 000.

Protéinurie de Bence-Jones, faite d'une protéine pure et homogène de mobilité électrophorétique β et de constante de sédimentation 3,1 S.

Moelle sternale : 31 % de plasmocytes avec de nombreuses formes jeunes.

L'immunoélectrophorèse pratiquée dans les conditions habituelles révèle seulement une diminution des γ-globulines.

En utilisant des concentrations sériques plus grandes, la méthode de Grabar, objective avec l'immunsérum 13417 de l'Institut Pasteur, un arc supplémentaire de mobilité β - γ se raccordant avec la ligne des γ-globulines. Cet arc apparaît aussi dans l'urine et il correspond donc à la protéine de B.-J., présente dans le sérum en assez grande quantité. L'ultracentrifugation du sérum confirme la présence d'une protéine de faible de poids moléculaire (3,4 S).

L'évolution a été rapide et l'atteinte cardiovasculaire de ce malade a précipité la mort, survenue par infarctus du myocarde en février 1962.

La nécropsie a confirmé le diagnostic de myélome plasmocytaire.

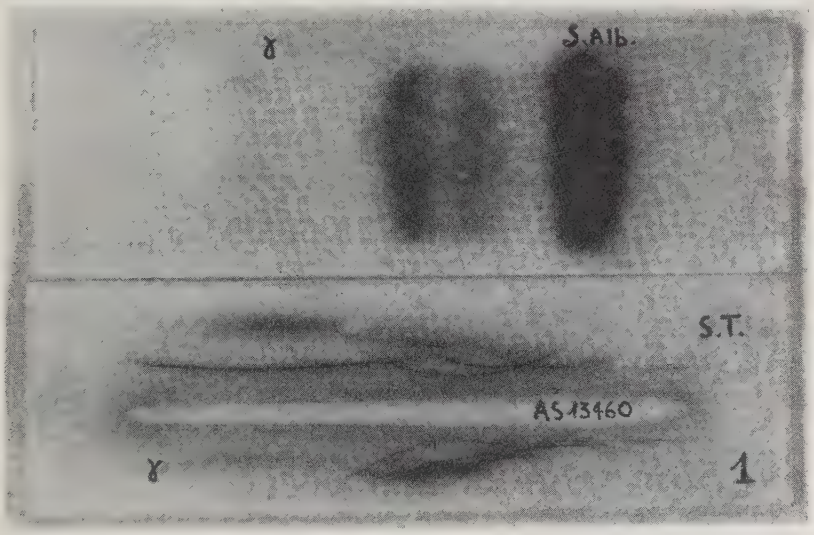


Figure 18. — Observation n° 13 : Electrophorèse en gélose, immunoélectrophorèse du sérum (AS 13460) (1).

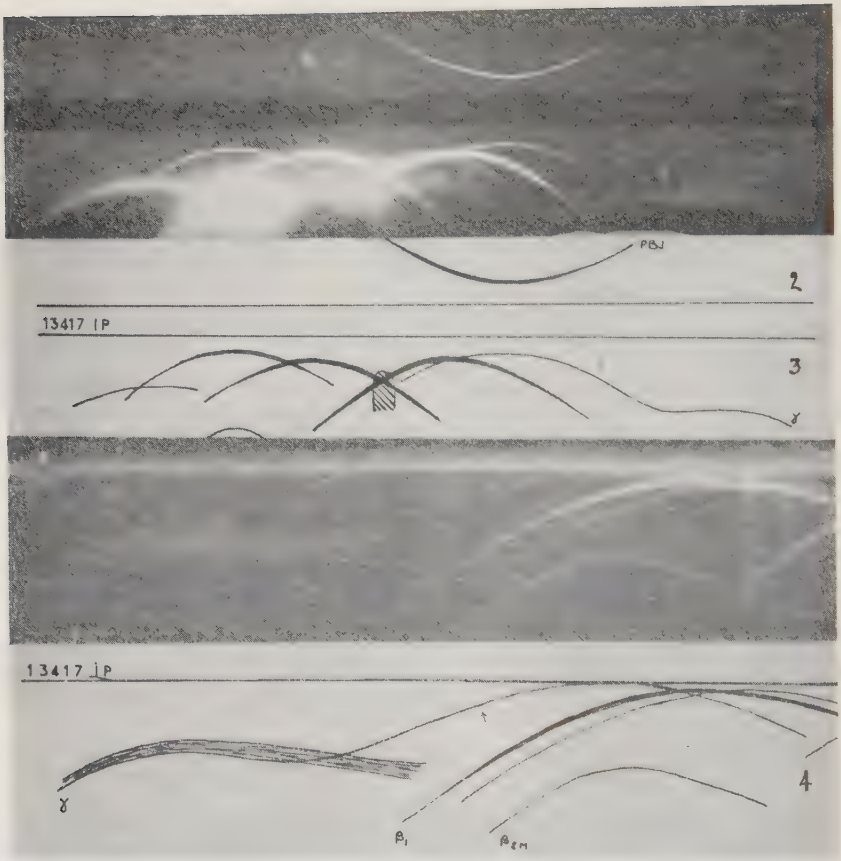


FIGURE 18 *bis.* — Immunoélectrophorèses des urines et du sérum à concentrations plus fortes par la technique de Grabar (2), (3), (4).

OBSERVATION N° 14.

M. RID..., 52 ans.

— En novembre 1959 baisse de vision brutale, bilatérale avec prédominance gauche, accompagnée de céphalées frontales.

— En janvier 1960, hospitalisation à la Clinique ophtalmologique de la Cité Hospitalière de Lille (Professeur FRANÇOIS).

Acuité visuelle : 4/10 non améliorable.

L'examen ophtalmologique montre :

— à droite : papille congestive avec quelques exsudats épars,

— à gauche : même aspect papillaire - exsudats ouatés disséminés évoquant des nodules dysoriques.

L'examen clinique et radiologique est normal.

Bilan biologique :

V.S. : 13/22.

Examens classiques normaux.

Biopsie musculaire normale, permettant, semble-t-il d'éliminer une collagénose.

— En mars 1960, les lésions du fond d'œil se développent avec œdème, importante dilatation veineuse, hémorragies.

L'électrophorèse montre un pic γ aigu et homogène (24,5 % de γ-globulines), prenant intensément la coloration par le réactif de Schiff.

L'immunoélectrophorèse révèle la disparition des β_{2a}- et β_{2m}-globulines.

La globuline anormale forme un arc très incurvé, interrompu à sa partie centrale, plongeant vers la gouttière des anticorps.

Bien qu'il n'y ait pas de lésion radiologique. pas de protéinurie de B.-J., pas de plasmocytose médullaire importante (8 %) ; le diagnostic de myélome plasmocytaire est retenu, se manifestant donc sous forme de rétinite dysorique.

FIGURE 19. — Observation n° 14 : Electrophorèse en gélose du sérum : protéinogramme coloré au Vert de Lissamine, glycoprotéinogramme coloré à l'acide periodique-réactif de Schiff, lipoprotéinogramme coloré au Noir Soudan.

Observation N° 15.

M. CAN..., 84 ans.

— Pas d'antécédents notables.

— En octobre 1960, lombalgies avec irradiation sciatique droite.

— En janvier 1961, hospitalisation dans le service de Traumatologie de la Cité Hospitalière de Lille (Professeur Decoulx).

L'examen clinique montre une raideur lombaire avec scoliose à concavité gauche. La percussion de l'épineuse de L2 est douloureuse.

Les réflexes tendineux sont diminués. Pas de Babinski, pas de Lasègue. Il existe une dysurie légère ; la prostate est modérément hypertrophiée et de consistance normale.

— Examens radiographiques :

- tassement très net du corps vertébral de L4 et de L2 (moins important) ;
- reste du squelette normal.

— Examens biologiques :

V.S. : 129/131.

Anémie autour de 3 200 000 GR.

Phosphatases acides et alcalines normales.

Protéines totales : 75 g p. 1 000.

Electrophorèse :

Albumine		37,9 %
Globulines	α_1	6,5 %
»	α_2	6,5 %
»	β	44,0 %
»	γ	8,1 %

Moelle sternale : 22 % de plasmocytes.

Protéinurie de B.-J. : présente.

Il s'agit donc d'un β-myélome, confirmé par l'immunoélectrophorèse : anomalie de l'arc de la β_{2a}-globuline révélée nettement par l'antisérum humain total et plus encore par l'immunsérum anti-β_{2a}.

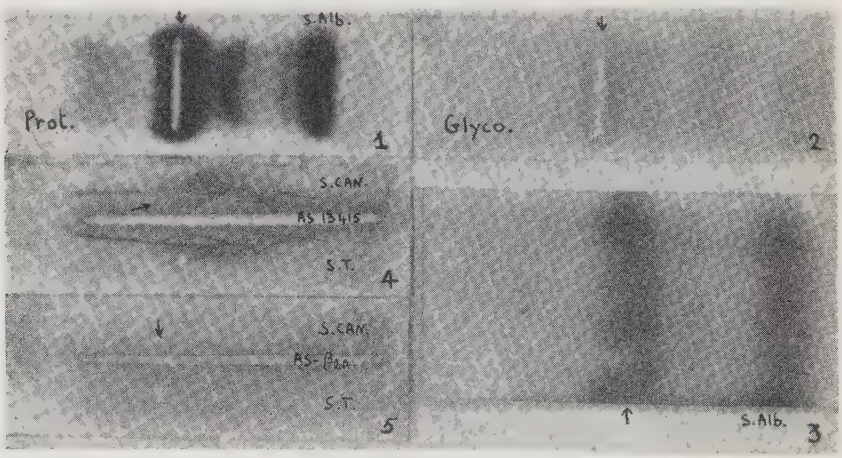


Figure 20. — Observation n° 15 : Electrophorèse en gélose : protéinogramme (1), glycoprotéinogramme (2). Electrophorèse sur papier avec coloration à l'Amido-schwarz. Immunoélectrophorèse du sérum avec révélations par l'anti-sérum total de l'Institut Pasteur (4) et par un sérum anti-β_{2a}-globulines (5).

En résumé, nous voyons que dans ces diverses observations, le diagnostic a pu être porté par des éléments très divers, d'orientation ou de certitude.

1° Sur nos 15 cas, les examens clinique et radiographique n'ont été vraiment évocateurs que dans 4 observations. Dans 3 autres cas, la suspicion clinique a été juste, confirmée par la preuve anatomo-pathologique ou biologique (N°s 5, 6 et 11). Dans les 8 derniers cas, aucun élément clinique ou radiographique n'orientait le diagnostic.

2° Le médullogramme a été typique dans 8 cas, alors que la biopsie osseuse a révélé une nappe plasmocytaire dans 2 observations (N°s 5 et 12). Dans 4 cas enfin, la moelle sternale a été normale.

3° Les perturbations électrophorétiques du sérum ont été nettes dans 11 cas, faiblement marquées dans 2, absentes dans 2 cas, dont l'un (N° 13) présentait même une hypo-γ-globulinémie.

Dans la majorité de nos observations, les diagrammes électrophorétiques sont nets, avec une bande dense, homogène et étroite, tant sur papier qu'en gélose.

4° La recherche thermique de la protéinurie de Bence-Jones a été seulement positive dans 4 cas sur 15. Cependant, nous n'avons pu, faute d'antisérums convenables, utiliser la détection immunologique.

5° L'immunoélectrophorèse du sérum a montré constamment les perturbations myélomateuses classiques du système des globulines immunes.

Les anomalies rencontrées sont de tous les types :

— épaississement, aspect symétrique et fortement concave du trait de précipitation des γ-globulines, avec ou sans précipitation de la protéine anormale au sein de la gélose ;

— dédoublement de la ligne γ ;

— précipitation large, plongeant dans la gouttière des anticorps, avec souvent redissolution du fait de l'excès d'antigène.

Ces perturbations atteignent le plus souvent les γ-globulines (13 cas) avec des mobilités variables, γ rapides, γ, γ lentes. Dans un seul cas, nous avons eu une perturbation de la β_{2a}-globuline et dans un autre, une protéinémie de Bence-Jones.

CHAPITRE II

ISOLEMENT DES PROTEINES MYELOMATEUSES

Pour chacun de nos malades, les protéines anormales sériques et urinaires ont été isolées et purifiées, puis soumises à des critères de pureté électrophorétique et immunologique.

1. — PARAPROTEINES SERIQUES

A) Méthode générale d'isolement.

Les protéines myélomateuses sont isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose selon la technique n° 2 de Biserte et coll. (35) analogue à celle préconisée par Peterson et Sober (275).

L'échangeur utilisé a été :

— soit préparé directement à partir de cellulose « Solka-Floc » selon le procédé de Peterson et Sober (275) ;

— soit un produit commercial (Eastman Kodak).

Le poids de DEAE-cellulose pour chaque fractionnement est d'environ 1 g pour 80 mg de protéines.

1° La technique de préparation des colonnes chromatographiques est la suivante :

La DEAE-cellulose, placée dans le tampon initial est homogénéisée par agitation mécanique, puis décantée trois fois pour éliminer les particules les plus fines qui ne sédimentent pas rapidement.

Le pH de la suspension, toujours assez nettement alcalin, est ensuite ajusté au pH du tampon de départ avec une solution d'acide phosphorique à 1 %.

L'échangeur en suspension est dégazé sous vide puis versé dans la colonne garnie à son extrémité inférieure d'un peu de laine de verre, et tassé sous pression jusqu'à ce qu'il reprenne, par son élasticité propre, un volume constant.

Une pastille de polyurée, taillée aux dimensions intérieures de la colonne est placée à la partie supérieure de la résine puis la colonne est lavée une nuit avec le premier tampon, à la température choisie pour la chromatographie c'est-à-dire, dans nos expériences, 18° C (pièce à température constante) ou 0° C (chambre froide).

2° Le système tampon, réalisant un gradient discontinu de molarité croissante et de pH constant, est formé par des solutions de phosphate de sodium :

— tampon 1 0,005 M pH 8
— » 2 0,01 M »
— » 3 0,02 M »
— » 4 0,035 M »
— » 5 0,05 M »

Ces tampons sont préparés à partir de solutions de phosphate monosodique et disodique (B.D.H.) de molarité identique (par exem- 0.005 M pour le tampon 1) et mélangées en proportion convenable pour obtenir un pH de 8.

3° La chromatographie est effectuée à température constante, soit 0°, soit 18° C. Des fractions de 10 ml environ sont recueillies sur collecteur automatique et leur absorption dans l'ultraviolet déterminée au spectrophomètre à 278 mμ (spectrophomètre Jobin et Yvon ou Beckman D.B.). On trace alors la courbe d'élution protéique, permettant le changement de tampon lorsque la densité optique est redevenue voisine de 0.

Les diverses fractions du pic paraprotéique sont réunies, dialysées contre l'eau distillée puis lyophilisées.

B) **Critères de pureté.**

Lorsque le sérum est soumis à la chromatographie, la plupart des protéines sériques sont retenues sur l'échangeur et la paraprotéine est obtenue pure.

Cependant des souillures de γ-globulines normales peuvent être présentes, en particulier lorsque l'on fractionne les γ-globulines isolées par relargage au sulfate d'ammonium, et il importe de faire un contrôle électrophorétique et immunoélectrophorétique des paraprotéines obtenues.

Ces protéines lyophilisées sont reprises dans une solution de chlorure de sodium à 8,5 p. 1 000 (5 mg de protéines pour 0,1 ml de soluté physiologique), puis analysées.

— *L'électrophorèse sur papier* est pratiquée en appareil horizontal de type Elphor sur papier Schleicher et Schüll 2043 A Mgl, en tampon véronal sodique - HCl de pH 8,9 et de force ionique 0,1. La migration dure 16 heures sous un potentiel de 1,7 volts/cm.

Après séchage à la température ambiante, fixation quelques minutes à l'étuve à 100°, les bandes sont colorées à l'Amido-schwarz.

— *L'électrophorèse en gélose* est réalisée en microméthode, sur lame de verre de 7,5 cm × 2,5 cm. Le gel contient 1,25 % d'agar-agar et l'on utilise 3 ml de gélose tamponnée avec une solution de véronal de pH 8,2 et force ionique 0,05. Ce tampon est également celui qui remplit les bacs de la cuve.

La migration est réalisée en cuve horizontale, étanche, pendant 2 heures sous un potentiel de 3 volts/cm.

Les lames sont ensuite fixées dans un mélange éthanol - acide acétique - eau (60 :3 :37), puis séchées en déposant au-dessus un morceau de papier filtre et enfin colorées au Vert de Lissamine.

— *L'immunoélectrophorèse* est pratiquée, toujours en microméthode, selon la technique de Scheidegger (318).

L'électrophorèse dure 2 heures comme précédemment, puis l'immunsérum est déposé et la diffusion s'effectue en 48 heures en chambre humide à 18°.

Après lavage 48 heures à l'eau courante, les lames sont séchées et colorées au Vert de Lissamine.

Les antisérums utilisés sont :

— soit un sérum équin polyvalent anti-protéines sériques humaines (Institut Pasteur) ;

— soit un sérum de lapin anti-γ-globulines ou anti-β_{2a} globulines.

Le sérum anti-γ-globulines a été préparé à partir d'une fraction II de Cohn qui contient les γ-globulines et quelques globulines différentes.

Le sérum anti β_{2a}-globulines a été préparé avec du lait de femme délipidé et fractionné au sulfate d'ammonium.

— L'électrophorèse en gel d'amidon enfin a été utilisée pour étudier certains sérums et pour démontrer l'hétérogénéité électrophorétique des protéines de B.-J.

Elle est réalisée en cuve horizontale selon la technique de Moretti et coll. (231).

Le système tampon utilisé est le système discontinu de Poulik (288) : solution de tris-(hydroxy-méthyl)-aminométhane pour la préparation du gel d'amidon, tampon borate pour les bacs de l'appareil. Les bandes sont colorées à l'amido-schwarz après une migration de 4 heures sous un potentiel d'environ 6 v/cm.

C) Résultats. Exemples d'application de ces méthodes.

Les échantillons soumis au fractionnement ont été :

— soit le sérum lui-même directement,

— soit le sérum chromatographié en 2 temps,

— soit des γ-globulines myélomateuses isolées au préalable par relargage au sulfate d'ammonium, du sérum des malades.

1°*Chromatographie directe du sérum.*

Le sérum est d'abord équilibré contre le tampon de départ par dialyse à + 4° C. Il est ensuite centrifugé pour éliminer le faible précipité d'euglobulines. La colonne chromatographique de DEAE-cellulose, préparée dans le tampon de départ (0,005 M) est longuement lavée avec ce tampon, puis elle reçoit le sérum dialysé et centrifugé.

Le recueil des fractions sur collecteur automatique est alors commencé et lorsque le sérum a pénétré complètement dans l'échangeur,

le premier tampon d'élution est mis en route ; puis, lorsque la densité optique à 278 mμ est redevenue voisine de 0, on met le 2e tampon et ainsi de suite jusqu'au 5e tampon de molarité 0,05 M.

Dans tous les cas, les pigments et la plupart des protéines plasmatiques sont retenus et on obtient une courbe d'élution caractéristique du type de myélome envisagé.

— Dans le cas de γ-myélome, la fraction anormale passe dans le tampon 1 de molarité faible, sous forme d'un pic aigu comme le montre la figure 21.

Les sommets rencontrés dans les tampons 2 et 3 sont de faible amplitude et négligeables, liés généralement au changement de tampon qu'impose ce système discontinu.

La fraction T4 représente la β_{2a}-globuline plus ou moins souillée de β-lipoprotéines et d'α_2-globulines.

Les tubes correspondant à la fraction anormale T1 sont réunis, la solution est dialysée contre l'eau distillée à + 4° C puis lyophilisée. La pureté de la protéine lyophilisée est vérifiée par divers critères : électrophorèse sur papier, en gélose et surtout immunoélectrophorèse.

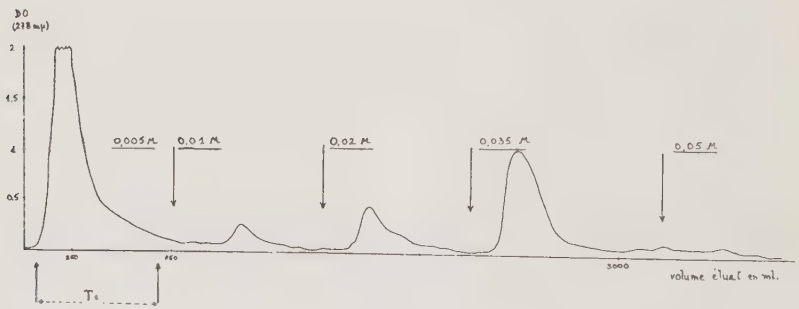


Figure 21. — Chromatographie sur DEAE-cellulose d'un sérum myélomateux, (obs. n° 6). La globuline anormale est éluée dans le premier tampon de molarité 0,005 M et la fraction T_1 est recueillie.

La figure 22 montre bien sur l'immunoélectrophorèse l'arc unique de la paraprotéine dont la mobilité électrophorétique est reste inchangée après la chromatographie.

Dans le cas de β-myélome, on observe en zone d'élution N°1 un faible pic de γ-globulines normales et la paraprotéine est éluée dans le dernier tampon sous forme d'un pic large et empâté, ce qui est observé surtout lorsque l'échangeur a été synthétisé directement au laboratoire. Les DEAE-celluloses commerciales donnent en effet plus facilement des pics aigus et symétriques, le pouvoir séparatif est cependant très comparable : Figure 23.

Les critères de pureté de la protéine anormale β_{2a} sont toujours électrophorétiques et immunoélectrophorétiques. Ils sont représentés sur la figure 24 où n'apparaît qu'une seule protéine de mobilité β_2 et d'antigénicité β_{2a}, qui correspond bien à la protéine anormale.

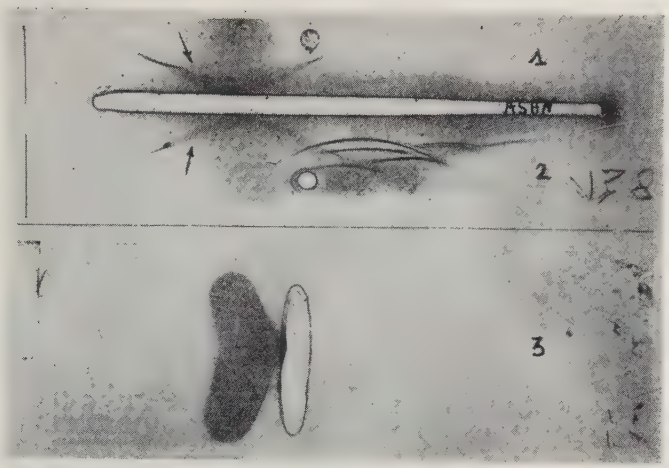


FIGURE 22. — Contrôle de pureté électrophorétique (3) et immunoélectrophorétique (1) de la fraction T_1. En (2) le sérum pathologique (obs. n° 6).

2° *Chromatographie du sérum en 2 temps.*

Dans quelques cas nous avons observé que la DEAE-cellulose, pourtant préparée dans des conditions toujours identiques, ne retenait pas les pigments sériques et que la fraction T1 était manifestement impure, colorée et hétérogène.

Nous avons donc repris cette fraction après l'avoir dialysée et lyophilisée ; dissoute dans un minimum de tampon 1, elle est passée à nouveau sur une autre colonne. La fraction T'1 obtenue est alors facilement recueillie et les contrôles de pureté effectués.

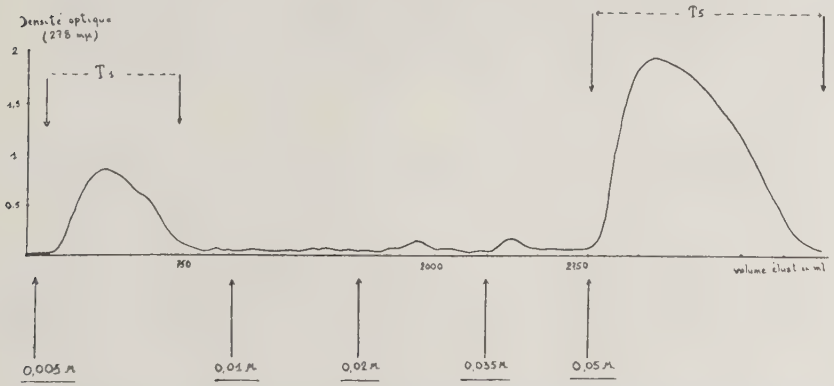


FIGURE 23. — Chromatographie sur DEAE-cellulose d'un sérum de β-myélome. La protéine anormale est éluée dans le dernier tampon de molarité 0,05 M : T_5. La fraction T_1 représente les γ-globulines normales assez nettement diminuées (obs. n° 15).

La courbe d'élution et les images électrophorétiques et immuno-électrophorétiques des fractions T1 et T'1 sont représentées dans les figures 25 et 26.

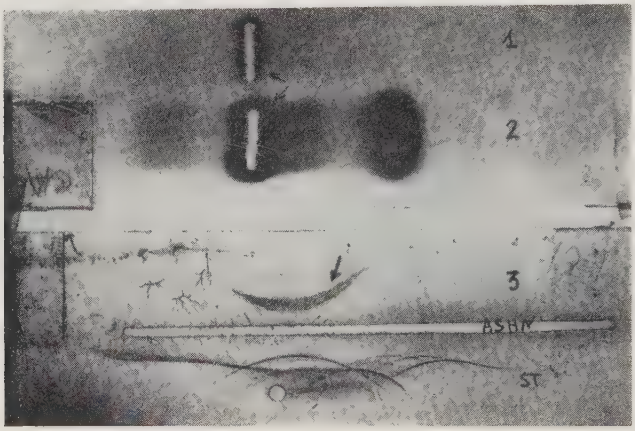


FIGURE 24. — Contrôle de pureté électrophorétique (1) et immunoélectrophorétique (3) de la fraction T_5 (obs. n° 15).

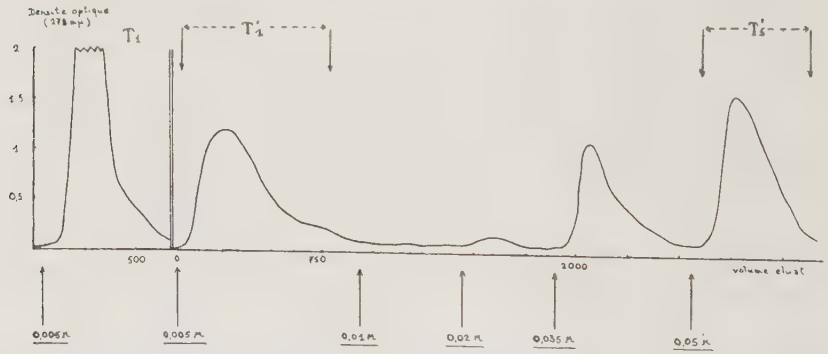


FIGURE 25. — Courbe d'élution sur DEAE-cellulose d'une paraprotéine myélomateuse. Chromatographie en deux temps pour éliminer toute souillure. La fraction T_1 est recueillie (observation n° 2).

3° *Chromatographie des « γ-globulines » isolées par relargage.*

Pour simplifier le fractionnement, il est classique d'opérer d'abord sur le sérum un relargage au sulfate d'ammonium à 33 % de saturation pour précipiter les γ-globulines.

C'est ce que nous avons fait sur certains de nos sérums myélomateux. Le pH du sérum est amené à 6,4 par quelques gouttes d'acide acétique, puis la précipitation faite en ajoutant la quantité nécessaire de sulfate d'ammonium saturé pour obtenir une concentration finale de 33 %.

Ce précipité est recueilli par centrifugation, lavé trois fois au sulfate d'ammonium à même saturation pour éliminer au maximum les traces d'albumine ; il est enfin remis en solution dans l'eau distillée, puis lyophilisé. Il existe cependant toujours des impuretés comme le montre l'immunoélectrophorèse (figure 27 [2]) ; il faut donc pratiquer ensuite une chromatographie pour obtenir la paraprotéine pure.

Pour la chromatographie, ces « γ-globulines » myélomateuses sont dissoutes dans un volume minimum de tampon N° 1.

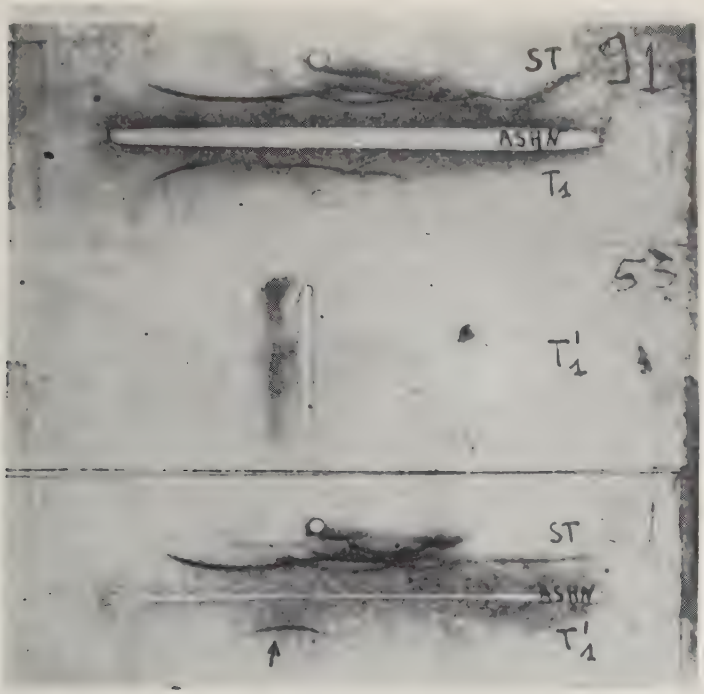


FIGURE 26. — Aspect immunoélectrophorétique de la fraction T_1 : souillure par des γ-globulines normales et des β-globulines. — La deuxième fraction chromatographique T_1' au contraire se révèle pure en électrophorèse et immunoélectrophorèse (observation n° 2).

L'aspect du chromatogramme et les résultats des contrôles de pureté de la fraction T1 sont présentés dans les figures 27 et 28. Ici encore la protéine anormale est faiblement retenue et est éluée dans le premier tampon.

— Une technique absolument identique a été utilisée pour fractionner des γ-globulines normales (fraction II de Cohn) contenant toujours quelques impuretés. On a ainsi pu obtenir une fraction pure de γ-globulines qui servira de témoin pour les diverses hydrolyses enzymatiques.

2) **Protéines de Bence-Jones.**

Lorsque présentes dans l'urine à des taux élevés, les protéines de B.-J. ont été isolées par relargage au sulfate d'ammonium, à pH 5,5, avec une concentration saline de 60 % de saturation.

Le précipité est lavé plusieurs fois au sulfate d'ammonium à 60 % de saturation, repris dans l'eau distillée, dialysé contre eau courante et eau distillée, puis lyophilisé.

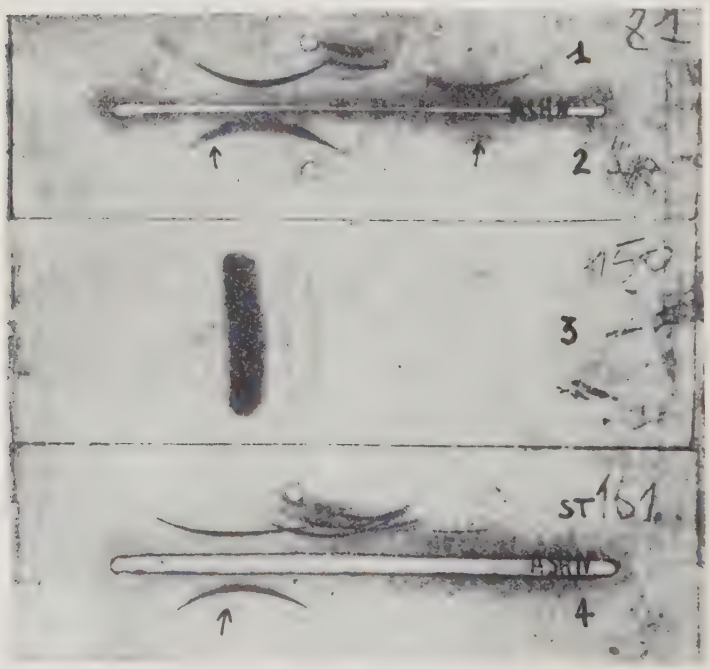


FIGURE 27. — Contrôle électrophorétique (3) et immunoélectrophorétique (4) de la pureté de la fraction chromatographique recueillie. — En (1), immunoélectrophorèse du sérum (obs. n° 10), en (2) les « γ-globulines » obtenues par relargage au sulfate d'ammonium à 33 % de saturation. Il persiste une trace de sérum-albumine.

Dans quelques cas, les protéines de B.-J. obtenues étaient souillées de pigments urinaires ou de protéines diverses (sérum-albumine).

Une chromatographie a été alors pratiquée sur DEAE-cellulose en utilisant pour l'élution un seul tampon phosphate de molarité 0,2 M et de pH 7 (JIRGENSONS et coll.) (180). La protéine de B.-J. est obtenue pure et non colorée.

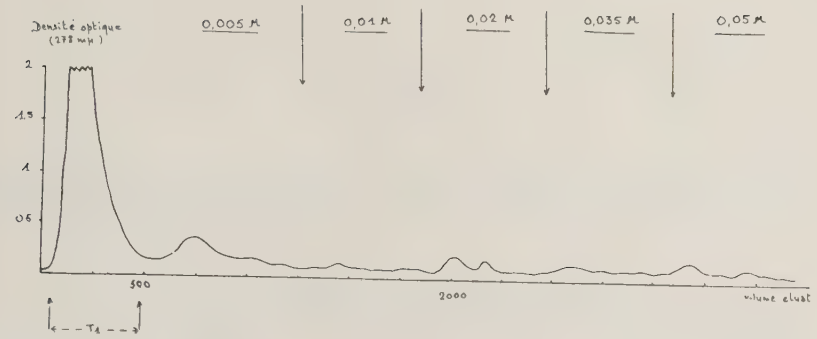


FIGURE 28. — Courbe d'élution chromatographique sur DEAE-cellulose de « γ-globulines » myélomateuses, obtenues par relargage au sulfate d'ammonium.

En conclusion, il faut insister sur l'intérêt des techniques de chromatographie sur DEAE-cellulose.

Elles constituent un procédé simple et satisfaisant pour préparer des quatités suffisantes de protéines pures. Les critères et contrôles de pureté sont bons et la méthode est particulièrement intéressante pour les protéines anormales du myélome. Elles peuvent être utilisées directement sur le sérum ou sur une préparation de « γ-globulines » myélomateuses, obtenue par précipitation à 33 % de sulfate d'ammonium.

CHAPITRE III

Étude des groupements alpha-aminés terminaux.

A) METHODE DE DETERMINATION

Parmi les méthodes de détermination des groupements aminés libres, celle des dinitrophénylamino-acides de SANGER (317) est certainement la plus employée ; c'est elle que nous avons utilisée pour 10 de nos protéines myélomateuses.

1) Préparation de la DNP-protéine.

La condensation de la protéine avec le fluorodinitrobenzène est effectuée en milieu éthanol-bicarbonate :

500 mg de protéine sont dissous dans 20 ml de solution 0,8 M de bicarbonate de sodium. On ajoute 10 ml d'une solution alcoolique à 1 % de dinitrofluorobenzène préparée extemporanément. Le mélange est alors agité pendant 3 heures, à l'obscurité et à la température du laboratoire.

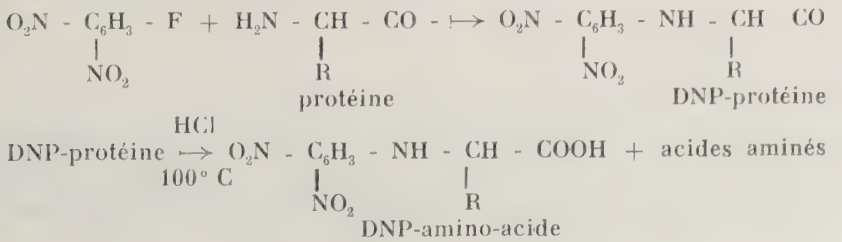
Au cours de cette préparation, il se forme aussi du dinitrophénol.

Après dinitrophénylation complète, la DNP-protéine est généralement insoluble, même en milieu alcalin. Après acidification, la DNP-protéine est séparée par centrifugation, lavée plusieurs fois à l'eau (pour enlever les sels minéraux), à l'alcool jusqu'à obtention d'un liquide surnageant incolore (pour enlever l'excès de dinitrofluorobenzène et de dinitrophénol) et finalement plusieurs fois à l'éther sulfurique.

2) Hydrolyse de la DNP-protéine.

Elle est effectuée en tube scellé, pendant 16 heures à 100-105° C, en présence d'acide chlorhydrique 5,6 N redistillé.

L'ensemble des réactions aboutissant au stade des DNP-amino-acides peut être ainsi schématisé :



Après hydrolyse les DNP-amino-acides éthérosolubles sont extraits par l'éther dans une ampoule à décantation.

Le solvant est évaporé et les DNP-amino-acides repris par un volume minimum d'acétone.

3) Identification des DNP-amino-acides.

a) *Chromatographie sur papier en deux dimensions.*

La première dimension est réalisée dans le système « toluène » de Biserte et Osteux (29) : toluène, pyridine, monochlorhydrine du glycol, ammoniaque 0,8 N, modifié par Lévy (197) (5 : 1,5 : 3 : 3), dont on utilise la phase légère pour une chromatographie ascendante, pendant 15 heures, à l'obscurité et à 21° C.

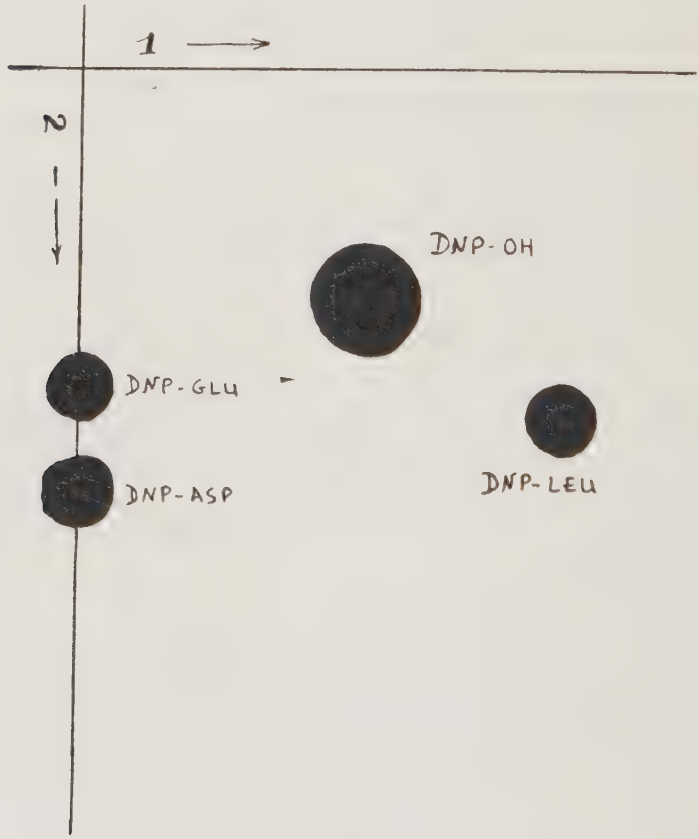


Figure 29. — Chromatographie bi-dimensionnelle d'un mélange de 3 DNP-amino-acides. Première dimension (1) système « toluène ». Deuxième dimension (2) tampon phosphate 3 M. DNP-OH : dinitrophénol ; DNP-Glu : DNP-acide glutamique ; DNP-Asp : DNP-acide aspartique ; DNP-Leu : DNP-Leucine.

La seconde dimension est représentée par une chromatographie descendante avec un tampon phosphate 1,5 M, pH 6 ou 3 M pour les DNP-amino-acides dicarboxyliques.

L'identification du ou des DNP-amino-acides présents est relativement facile par leur position sur la carte chromatographique ; on s'aide d'ailleurs de repères tels que le dinitrophénol, constamment présent, ou des témoins internes, ajoutés au point de départ, avant la chromatographie.

Un exemple de carte chromatographique est représenté sur la figure 29 où se trouvent les DNP-leucine, aspartique et glutamique.

Pour ces derniers cependant ,la séparation n'est pas toujours excellente même avec un tampon phosphate 3 M pour la seconde dimension.

On a alors intérêt à les séparer par électrophorèse.

b) *Séparation des DNP-glutamique et DNP-aspartique par électrophorèse à pH* 3,9.

Elle s'effectue directement, après extraction à l'éther et évaporation, dans un appareil en toit de type Durrum, avec un tampon de pH 3,9 : acide acétique, pyridine, eau (10 : 3 : 487).

Le point de dépôt est situé à 10 cm du côté cathodique de la feuille. L'électrophorèse dure 15 heures sous 400 volts.

Le DNP-acide aspartique migre davantage que le DNP-glutamique et la séparation est bonne.

La figure 30 représente la séparation électrophorétique de 10 échantillons de protéines myélomateuses et l'on voit bien la position du dinitrophénol, puis de l'acide glutamique, enfin de l'acide aspartique.

B) **RESULTATS**

En combinant les deux méthodes d'identification, électrophorèse et chromatographie bidimensionnelle, nous avons, pour 10 paraprotéines, obtenu les résultats suivants :

— Dans tous les cas, sauf un (n° 8), l'acide glutamique est présent en position N-terminale.

— Il est trois fois exclusivement rencontré (n°s 1, 4 et 7).

— Il est présent avec l'acide aspartique dans 6 cas, avec la leucine dans 1 cas.

— L'acide aspartique seul est représenté dans un échantillon (n° 8).

Dans les cas de N-aspartyl-N-glutamyl-globulines, nous avons essayé de connaître les proportions de chacun des acides aminés N-terminaux. Pour cela la tache de chacun d'eux est découpée dans la feuille d'électrophorèse, éluée par une solution aqueuse de bicarbonate à 1 %, et la densité optique de la solution est lue au spectrophotomètre à 360 mμ.

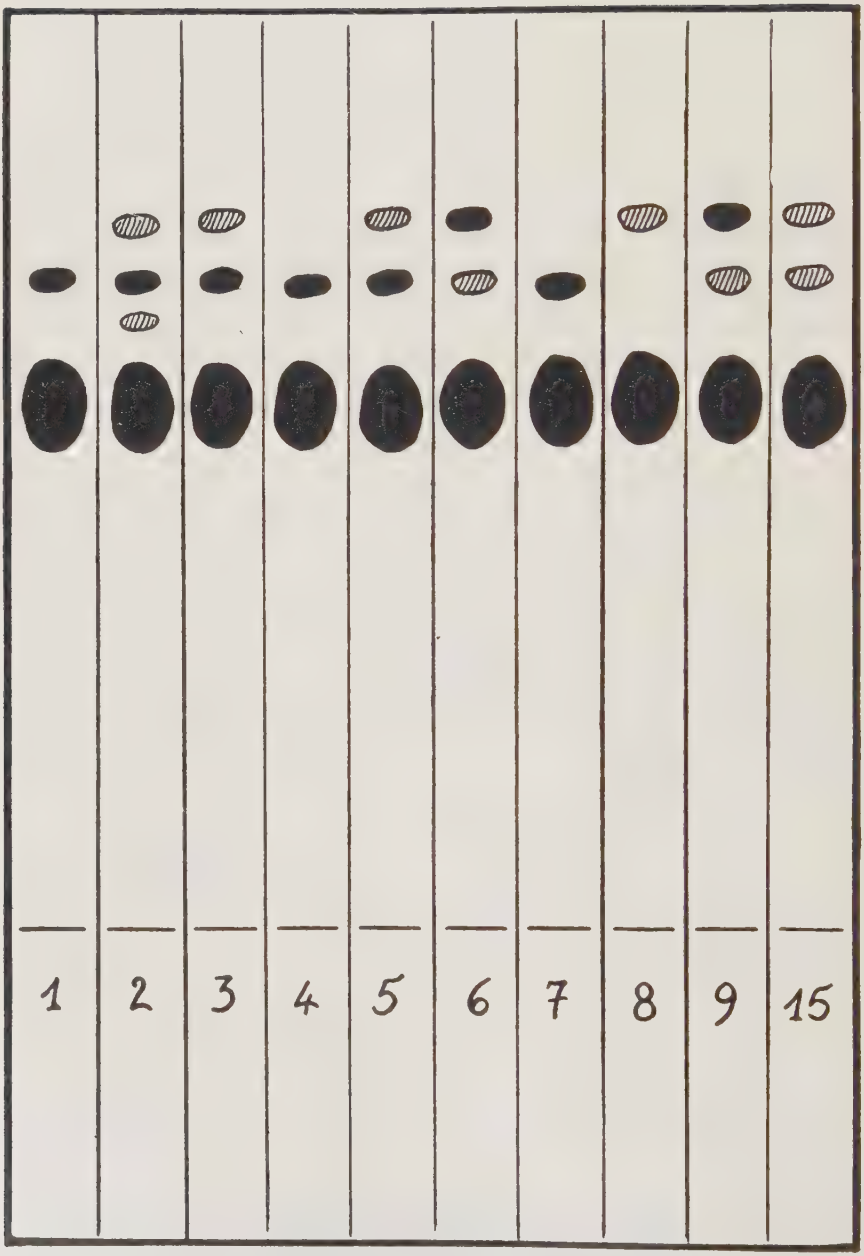


FIGURE 30. — Electrophorèse à pH 3,9 de mélanges de DNP-amino-acides. a : DNP-aspartique ; b : DNP-glutamique ; c : DNP-leucine ; d : dinitrophénol. Les chiffres correspondent aux numéros des observations.

Après correction par le facteur de Lévy (197), on obtient les valeurs suivantes :

n° 2	DNP Asp	0,025	
	» Glu	0,056	soit 2 fois plus de glutamique
	» Leu	0,080	
n° 3	» Asp	0,05	
	» Glu	0,17	
n° 5	» Asp	0,05	
	» Glu	0,27	
n° 6	» Asp	0,21	
	» Glu	0,11	
n° 9	» Asp	0,05	
	» Glu	0,07	

Nos résultats sont donc parfaitement en accord avec ceux de Putnam sauf pour la prédominance de l'acide aspartique comme le montre le tableau II.

	N-aspartyl N-glutamyl	*N-aspartyl*	*N-glutamyl*	*N-leucyl*	*Divers*
Statistique de Putnam (306)	5	10	8	2	6
Statistique personnelle	6	1	3	1	—

Tableau II. — Proportions des divers groupements aminés terminaux pour deux séries de protéines myélomateuses.

Il est à noter enfin que dans certains échantillons, de faibles traces de DNP-sérine ont été trouvées.

En résumé, la détermination des groupements α-aminés terminaux présente un triple intérêt :

— Elle nous permet une classification des protéines myélomateuses en 4 groupes principaux : N-aspartyl, N-glutamyl, N-aspartyl-N-glutamyl et N-leucyl-globulines.

— Elle constitue un critère de pureté supplémentaire. En effet, la découverte de DNP-amino-acides autres que les précédents, indique généralement la présence d'une souillure de la paraprotéine par d'autres protéines sériques.

— Elle a enfin un intérêt structural : la perturbation protéique du myélome correspond très probablement à une synthèse anormale de certaines chaînes des γ-globulines. La présence de la leucine N-terminale non rencontrée dans les γ-globulines normales en est une preuve.

Pour les chaînes N-aspartyl, N-glutamyl, nous ne pouvons parler d'anomalies puisque les γ-globulines normales renferment aussi ces deux acides aminés en position N-terminale. Nous pouvons seulement souligner les différences de proportions entre ces 2 aminoacides.

CHAPITRE IV

Hydrolyses enzymatiques des protéines myélomateuses.

(Séparation des peptides obtenus - Etude immunologique)

Nous avons vu que les premières expériences d'hydrolyse enzymatique sur des γ-globulines sont l'œuvre de SCHULTZE et SCHWICK (329), PORTER (285), PUTNAM et coll. (172), DEUTSCH et coll. (85).

Mais ces expériences se sont adressées tantôt à des γ-globulines animales (anticorps de lapin surtout), tantôt à des γ-globulines humaines, le plus souvent normales.

D'autre part, les divers auteurs se sont généralement souciés d'un seul aspect de la question :

tantôt aspect immunologique ;

tantôt aspect structural, par l'étude des peptides et polypeptides formés.

Enfin l'hydrolyse enzymatique est conduite généralement avec seulement deux types d'enzymes : papaïne et trypsine.

Il nous a donc paru intéressant de reprendre ces expériences d'hydrolyse en comparant les actions de divers enzymes protéolytiques, en envisageant la séparation des peptides formés et en étudiant enfin le comportement immunologique de l'hydrolysat.

A) METHODES D'HYDROLYSE

α) Les enzymes.

Nous avons utilisé des enzymes purifiés et cristallisés :

— trypsine (Worthington) ;

— α-chymotrypsine (Worthington) ;

— pepsine (Worthington, Touzart et Matignon) ;

— papaïne (Worthington) et mercuripapaïne. Celle-ci a été préparée à partir de la précédente par la technique de KIMMEL et SMITH (187) (188) : la papaïne, 2 fois cristallisée, est dissoute dans l'éthanol à 70 % contenant 0,001 M de chlorure mercurique. La concentration en enzyme doit être de 1,5 à 2 %. La solubilisation est généralement complète, sinon le léger trouble est filtré. En 3 ou 4 jours à + 4° C la cristallisation se produit et l'on recueille par centrifugation les cristaux insolubles dans l'alcool à 70° mais solubles dans l'eau.

b) **Dénaturation protéique.**

Après des essais de dénaturation par la chaleur (bain-marie à 100° C pendant quelques minutes) ou par abaissement du pH jusqu'à 1,5 (24 heures à pH 1,5 en milieu chlorhydrique), nous avons utilisé la dénaturation à l'alcool et chlorhydrate de guanidine (Holleman) (168) :

— La protéine, dissoute dans l'eau distillée, est additionnée de chlorhydrate de guanidine de façon à obtenir une concentration d'environ 0,2 M. On ajoute un volume d'alcool à 90° puis l'on agite une nuit à + 4°. Après une nouvelle addition de 3 volumes d'alcool, l'agitation est reprise pendant 4 heures. On ajoute ensuite 6 volumes d'acétone et le précipité protéique est recueilli par centrifugation puis lyophilisé.

Ces divers procédés de dénaturation ont été comparés par hydrolyse trypsique puis électrochromatographie (voir plus loin) des peptides formés.

La planche 1 permet de préciser les conditions optimum de dénaturation pour l'hydrolyse trypsique :

- *En 1,* la protéine (observation n° 15), non dénaturée, n'est pratiquement pas hydrolysée ; quelques peptides seulement apparaissent sur la carte. Une grosse tache protéique, prenant encore la coloration à l'Amidoschwarz et au Noir Soudan, est présente sur la ligne de départ de la chromatographie (Rf = 0).

- *En 2,* est représenté un hydrolysat trypsique de la même protéine, après tentative de dénaturation par la chaleur (chauffage à 100° C pendant 3 minutes).

L'hydrolyse est toujours incomplète, il y a des traînées, et peu de taches peptidiques, mais le nombre de celles-ci augmente cependant nettement.

- *En 3,* la protéine a été dénaturée par l'action du chlorhydrate de guanidine et de l'alcool.

L'hydrolyse et la séparation des peptides sont correctes ; il persiste une coloration à l'Amidoschwarz sur la ligne Rf = O, mais nous verrons qu'elle n'est pas due à une mauvaise dénaturation.

- *En 4* enfin, nous avons représenté un hydrolysat trypsique de protéine dénaturée par la technique précédente et oxydée par l'acide performique selon la technique de Hirs (167), indiquée plus loin. Il n'y a alors plus de résidu protéique et la coupure des liaisons disulfures par oxydation permet une meilleure séparation.

Bien que ce mode opératoire aboutisse à une meilleure séparation, nous ne l'avons guère utilisé par la suite car l'oxydation provoque une destruction intense du fragment protéique restant et peut-être aussi de certains peptides, rendant alors les études comparatives plus difficiles. C'est un procédé complémentaire qui permettrait éventuellement de mieux fractionner des lipopeptides.

C'est donc l'action de l'alcool et du chlorhydrate de guanidine qui représente le meilleur procédé de dénaturation du substrat ; c'est cette technique que, par la suite, nous emploierons régulièrement.

c) **Conduite des hydrolyses.**

1. *Hydrolyse trypsique.*

— 5 mg de trypsine sont dissous dans 2 ml d'HCl N/16 et incubés 24 heures à 37° pour éliminer toute trace d'autres endopeptidases, chymotrypsine notamment, pouvant être présentes comme impureté (Northrop et Kunitz) (246). La trypsine ainsi préparée doit être utilisée dans les heures suivantes.

— 50 mg de protéine dénaturée sont dissous dans 15 ml d'eau ; 5 ml de tampon phosphate pH 7,8 (PO_4HNa_2, $2H_2O$ 804 mg, PO_4H_2Na, $2H_2O$ 56 mg pour 100 ml d'eau) sont ajoutés ainsi que l'équivalent de 1 mg de trypsine incubée, soit 0,4 ml pour obtenir une concentration enzyme-substrat de 1 pour 50.

Le pH est ajusté à 8,5 avec NaOHN et le tout est mis à incuber 4 heures à l'étuve à 37° sous agitation magnétique douce.

A la quatrième heure, puis à la huitième, en raison de l'autolyse enzymatique (Gabeloteau et Desnuelle) (127), l'addition de 1 mg de trypsine est renouvelée et le pH rajusté à 8,5.

L'hydrolyse est maintenue pendant 24 heures, puis arrêtée par congélation. L'hydrolysat est ensuite lyophilisé.

2. *Hydrolyse chymotrypsique.*

— 50 mg de protéine dénaturée sont dissous dans 15 ml d'eau et 5 ml de tampon phosphate pH 7,8.

— 1 mg de chymotrypsine est ajouté et le pH ajusté à 8.

Comme pour la trypsine, 1 mg d'enzyme est encore ajouté au bout de 4 et 8 heures et le pH chaque fois ajusté avec de la soude normale.

L'hydrolyse dure 24 heures et l'hydrolysat est lyophilisé.

3. *Hydrolyse papaïnique.*

Nous utilisons soit de la papaïne cristallisée, soit de la mercuripapaïne. La protéine peut être hydrolysée par ces enzymes avec ou sans dénaturation préalable.

L'hydrolyse s'effectue ici en présence d'effecteurs tels que EDTA (sel disodique), cystéine et en milieu phosphate :

— 50 mg de protéine sont dissous dans 10 ml d'eau et 5 ml d'un tampon formé par le mélange, aux molarités indiquées, des constituants suivants :

phosphates de sodium pH 6	0,01 M
cystéine	0,01 M
EDTA	0,002 M

1 mg de papaïne ou mercuripapaïne est ajouté, le pH ajusté à 6 et l'hydrolyse à 37° sous agitation dure 16 heures. De nouvelles additions de papaïne sont effectuées au bout de 4 et 8 heures.

L'hydrolysat est ensuite congelé et desséché par lyophilisation.

4. *Hydrolyse pepsique.*

L'enzyme, toujours à la concentration de 1 pour 50, est utilisé à pH 2 et la protéine non dénaturée est dissoute dans 15 ml d'eau.

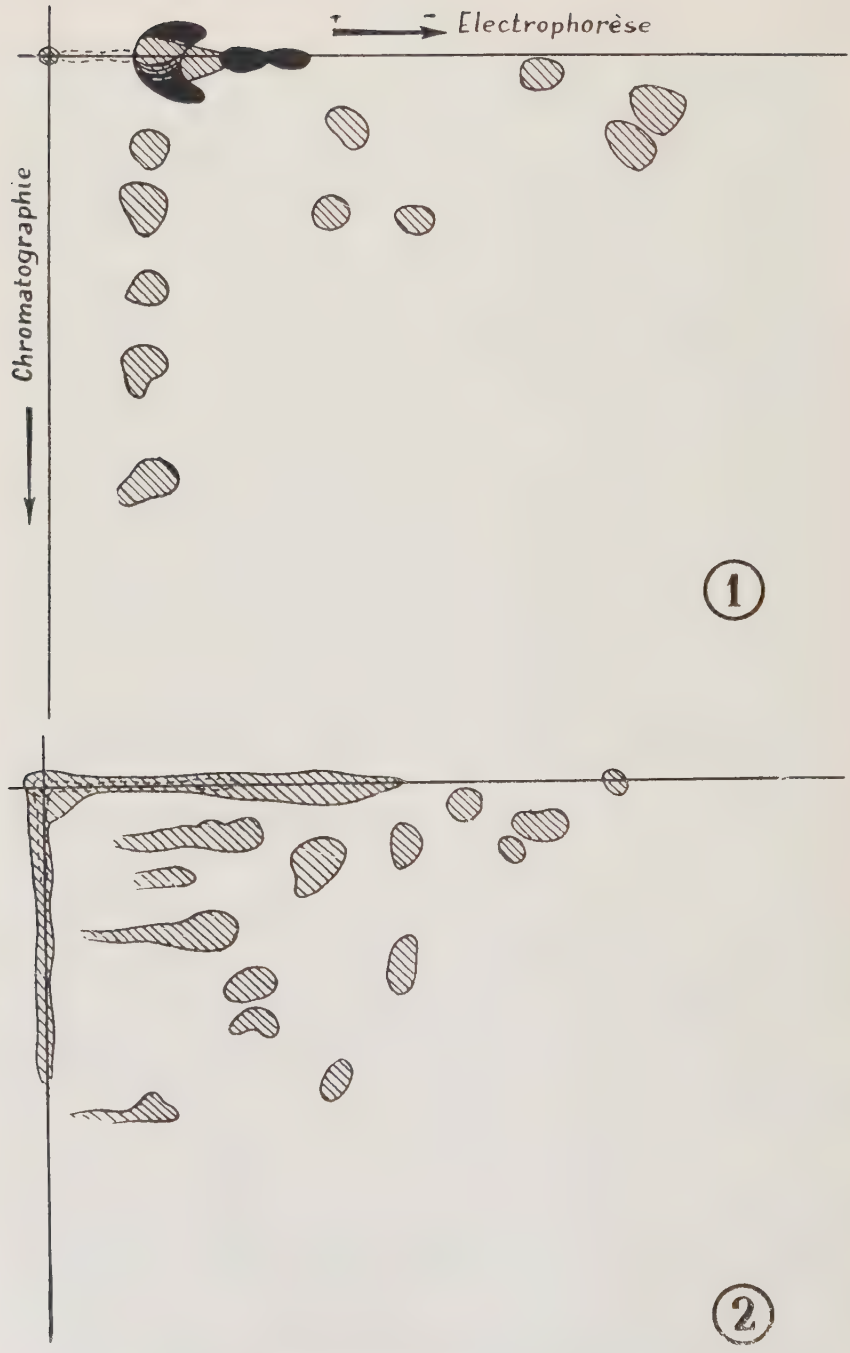
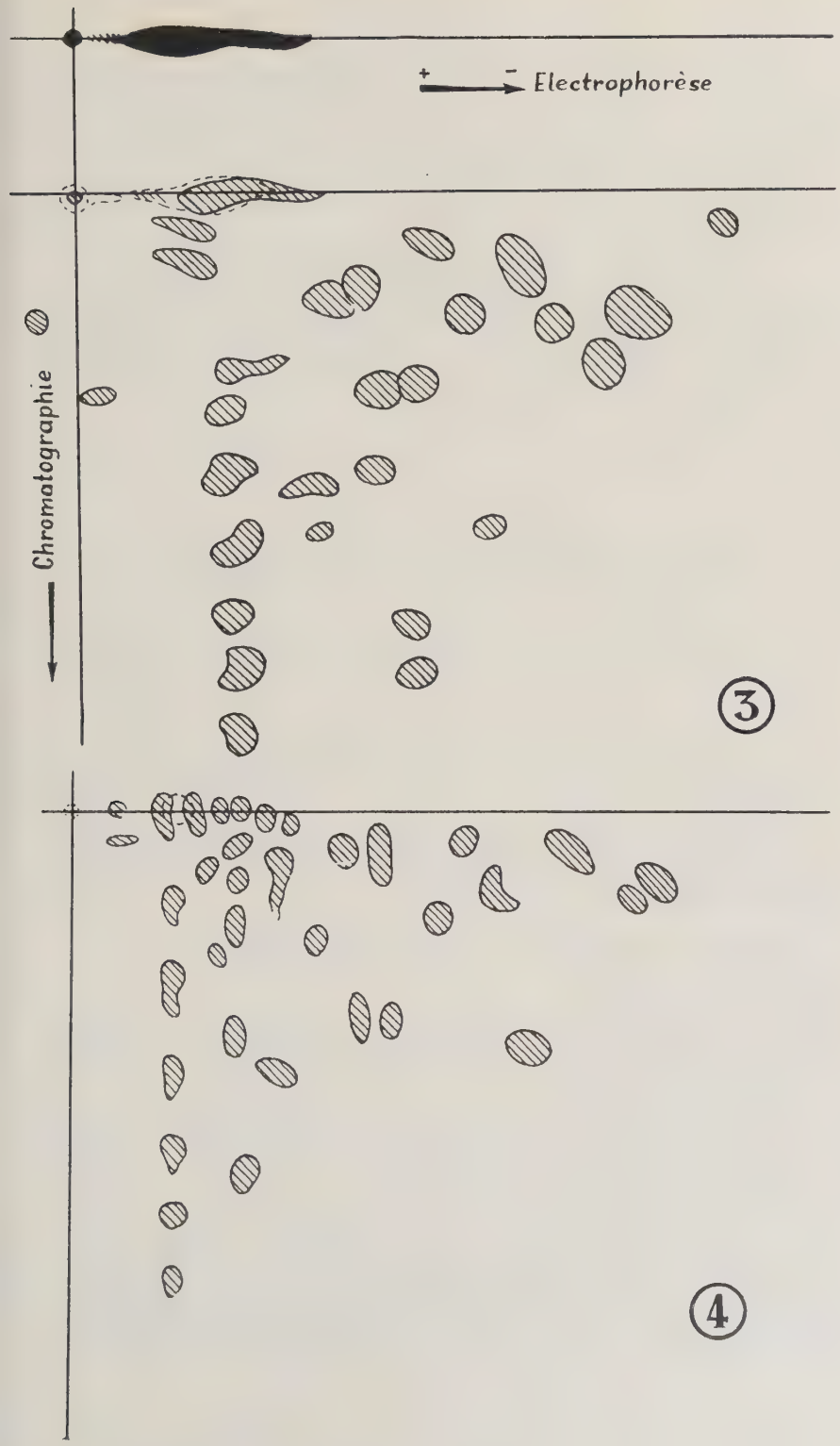


PLANCHE 1. — Cartes électrochromatographiques d'hydrolysats trypsiques d'une même paraprotéine, montrant l'influence de divers types de dénaturation (obs. n° 15). — (1) : Protéine non dénaturée ; (2) : Protéine dénaturée par la chaleur ; (3) : Dénaturation par l'alcool et le chlorhydrate de guanidine ; (4) : Dénaturation par la chaleur puis oxydation performique. — En grisé coloration à la ninhydrine, en noir coloration à l'amidoschwarz.


+
−
Electrophorèse
Chromatographie
3
4

Le pH est ajusté par HCl N et l'hydrolyse dure ici encore 24 heures à 37° avec toujours addition d'enzyme au bout de 4 et 8 heures.

L'hydrolysat est conservé après lyophilisation.

Après ces clivages enzymatiques, nous avons donc étudié les produits formés :

— soit sans autre traitement le plus souvent ;

— soit après oxydation performique selon la technique de Hirs (167) : 9 ml d'acide formique pur et 1 ml d'H_2O_2 à 110 volumes sont laissés en contact 2 heures à la température ambiante, puis 4 à 5 ml de ce mélange sont versés sur l'hydrolysat et abandonnés 4 heures en chambre froid à + 4° C. Un volume égal d'eau est ajouté puis le tout est placé sous vide à évaporer.

B) METHODES D'ETUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Le mélange complexe de peptides, polypeptides, voire même fragments de protéine non hydrolysés, a été analysé selon deux processus.

Tout d'abord nous avons essayé d'objectiver les divers peptides formés par électrophorèse puis chromatographie, réalisant ainsi des « cartes électrochromatographiques » où la position de chaque peptide peut être repérée.

Ensuite nous avons recherché, par immunoélectrophorèse, si les propriétés antigéniques des paraprotéines myélomateuses étaient conservées après diverses hydrolyses.

1) Séparation électrochromatographique des peptides.

a) *Technique :*

5 à 8 mg de chaque hydrolysat sont repris dans une goutte de soluté physiologique et déposés lentement et sous ventilation avec une micropipette sur une feuille de papier Whatman n° 1 ou 3, de dimensions 57 × 46 cm.

Tous nos électrochromatogrammes comparatifs ont été réalisés avec des quantités identiques de chaque hydrolysat et dans des conditions expérimentales constantes.

Le point de dépôt se fait à 20 cm du côté anodique et à 10 cm du bord de la feuille, comme le montre le schéma ci-contre :

On réalise alors, pour séparer les divers peptides de l'hydrolysat, un couplage bidimensionnel, électrophorèse à pH 3,9 — chromatographie descendante dans le *n*-butanol — acide acétique — eau (4 : 1 : 5).

1. L'électrophorèse est pratiquée selon une technique identique à celle utilisée pour la séparation des acides aminés et polypeptides des milieux biologiques (32).

Elle se fait dans un appareil « en toit » (type DURRUM) de grandes dimensions 70/42 cm, construit entièrement en chlorure de polyvinyle, sous 630 volts pendant 7 heures ou 450 volts pendant 15 heures, dans le sens de la plus grande longueur de la feuille.

Le tampon utilisé, de pH 3,9, présente la composition suivante : pyridine - acide acétique - eau (30 : 100 : 4870).

Les avantages de cette première étape électrophorétique sont nombreux :

— Le tampon est entièrement volatil, ne causant donc aucune gêne dans l'étape chromatographique ultérieure.

— L'électrophorèse ne nécessite qu'un appareillage simple : cuve de grande dimension et générateur de tension continue atteignant 650 volts sous 60 mA.

— La séparation enfin est déjà assez satisfaisante.

2. Après séchage à l'air ou sous ventilation, on effectue, dans la deuxième dimension de la feuille, une chromatographie descendante dans le système classique *n*-butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5). Ce mélange est soumis à deux décantations ; la phase aqueuse inférieure est déposée dans le fond de la cuve pour saturation et la phase supérieure est utilisée comme solvant chromatographique :

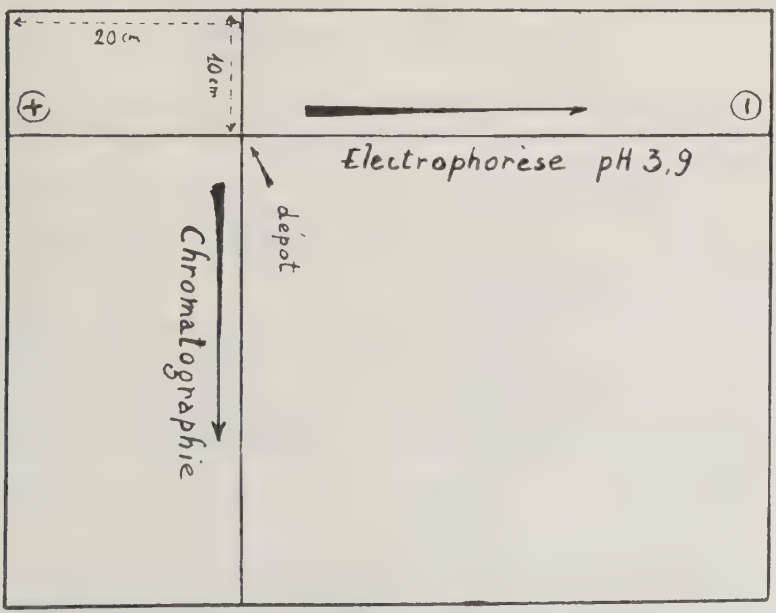


SCHÉMA n° 1. — Disposition du point de dépôt et des sens d'électrophorèse et de chromatographie.

— 150 ml par godet pour 2 feuilles Whatman 3 ;

— 120 ml environ pour 2 feuilles Whatman 1.

La chromatographie dure 18 à 20 heures à température constante (18° C).

Les feuilles sont ensuite séchées à l'air puis révélées par pulvérisation d'une solution de ninhydrine dans le *n*-butanol (100 mg pour 100 ml) et chauffage quelques minutes à 100° sous ventilation.

Les taches peptidiques apparaissent nettement et le maintien de leur coloration est assuré par pulvérisation d'une faible quantité de réactif de Kawerau : NO_3H à 10 % - nitrate de Cu saturé - éthanol (2 : 10 : 988).

On peut alors étudier la « carte peptidique » de l'hydrolysat, caractérisée par la place de chaque peptide ou polypeptide.

b) *Résultats :*

Avant d'envisager comparativement, pour chaque type d'hydrolyse enzymatique, γ-globulines normales et globulines myélomateuses, nous allons décrire un exemple de carte électrochromatographique, celle de l'hydrolysat trypsique de γ-globulines normales, planche 2.

On constate sur cette planche que la position de toutes les taches ninhydrine-positives dépend, soit du comportement électrophorétique, soit du devenir chromatographique. Dans ce dernier cas, il faut définir non plus le Rf des spots, puisque le front du solvant arrive à l'extrémité de la feuille, mais un Rf (peptide) défini par le rapport $\frac{\text{distance peptide « } \times \text{ »}}{\text{distance peptide le plus rapide}}$

On observe alors :

— une traînée de Rf (peptide) = 0 et correspondant soit à un noyau protéique résistant, soit à des molécules γ intactes, non encore attaquées ;

— 40 taches peptidiques ninhydrine-positives que l'on peut dans un but de simplification, répartir en différentes zones :

- suivant le comportement électrophorétique, nous pouvons en effet artificiellement séparer des zones acide, neutre, inter-neutre-basique et basique enfin ;

- dans le sens chromatographique on peut également tracer deux lignes de séparation correspondant à des Rf (peptide) de 0,30 et 0,65.

Ainsi est réalisé un quadrillage de la carte, qui permettra de comparer ensuite plus facilement les hydrolysats normaux et pathologiques ; éventuellement chaque tache peptidique peut être définie par sa case et son numéro.

En considérant la planche 2, deux constatations générales s'imposent :

1° les peptides de la zone neutre sont les plus nombreux ; la répartition des Rf (peptide) y est très large. Viennent ensuite les peptides inter-neutre-basiques et enfin les 5 peptides basiques, à la mobilité électrophorétique grande et au déplacement chromatographique faible ou nul.

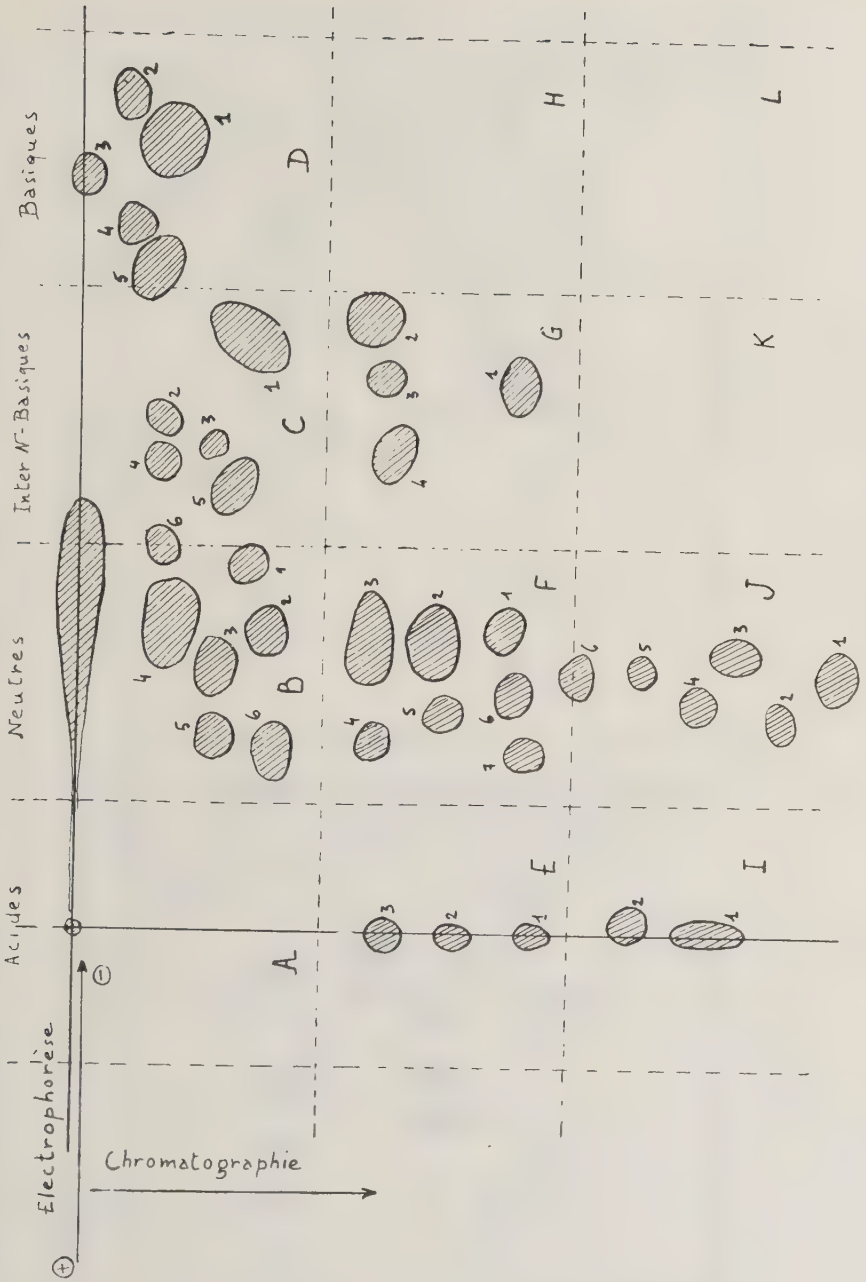
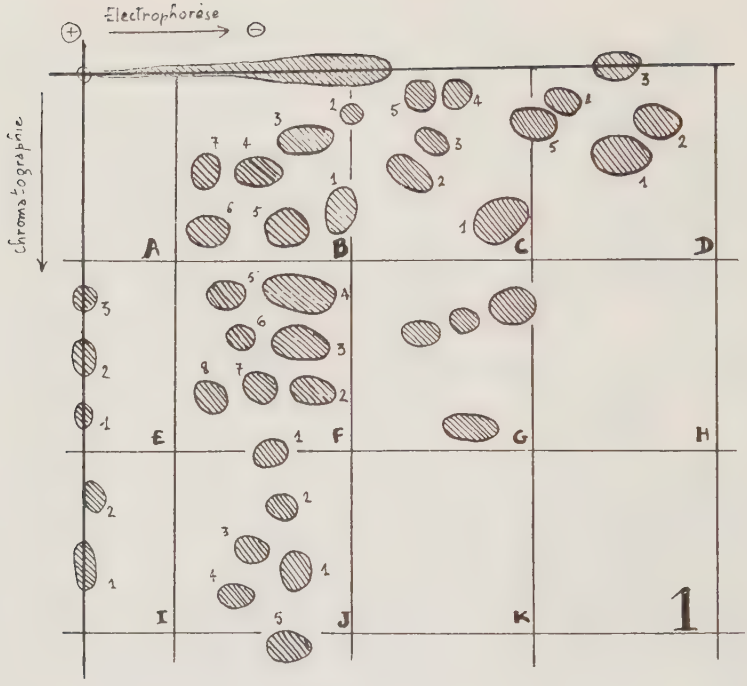


PLANCHE 2. — Carte électrochromatographique d'un hydrolysat trypsique de γ-globulines normales, montrant la séparation bi-dimensionnelle par électrophorèse puis chromatographie, les zones acide, neutre, inter-neutre-basique, basique et les lignes de R_f (peptide) 0,30 et 0,65. Les peptides sont numérotés par case.


Electrophorèse
⊕
⊖
Chromatographie
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
1

3

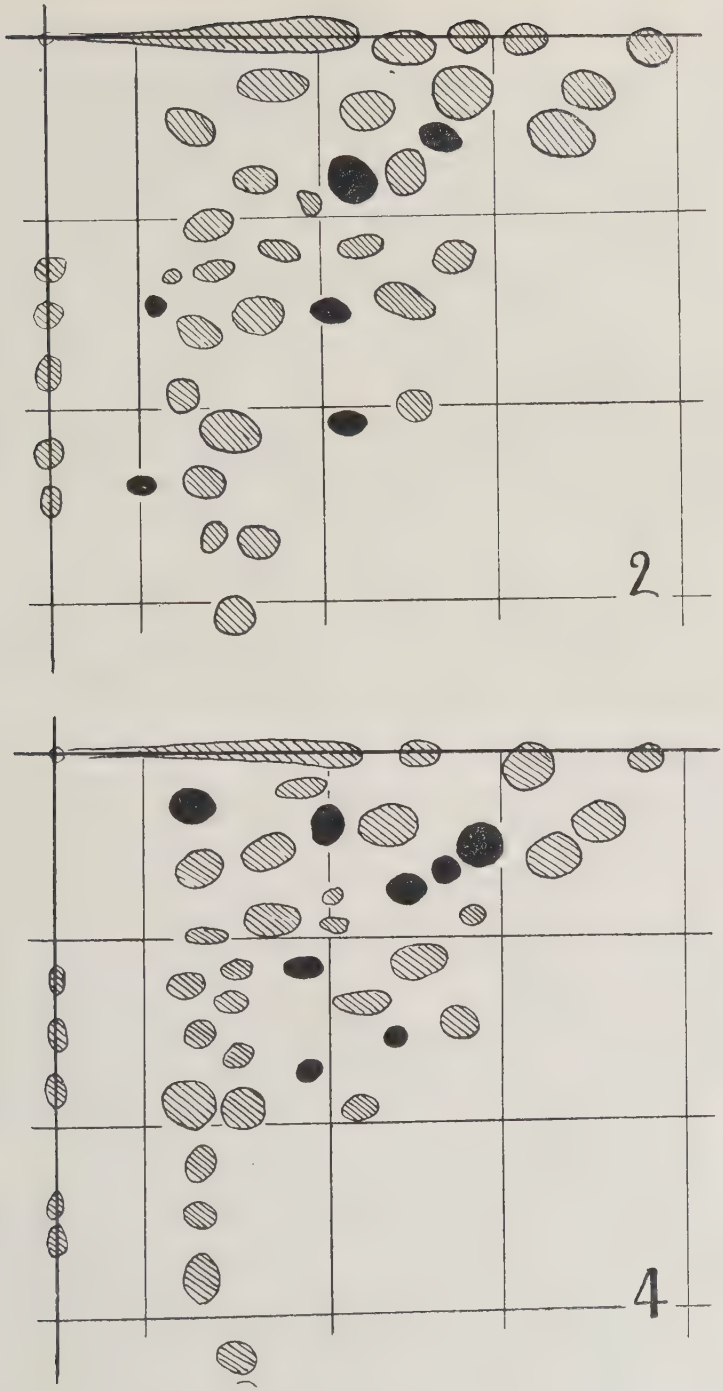


PLANCHE 3. — Cartes électrochromatographiques d'hydrolysats trypsiques de γ-globulines normales (1), et de 3 protéines myélomateuses (2) (obs. n° 9), (3) (obs. n° 7), (4) (obs. n° 5). — En noir apparaissent les peptides nouveaux, non rencontrés dans l'hydrolysat normal.

2° le nombre des peptides décelé est bien inférieur à celui que l'on devrait théoriquement trouver. On peut estimer en effet que le nombre de résidus de lysine et d'arginine dans la molécule complète de γ-globulines est de l'ordre de 170 ; cela devrait conduire à un nombre de peptides équivalent, du fait de la spécificité d'action de la trypsine, exclusivement localisée à la rupture des liaisons arginine et lysine.

Le plus petit nombre de peptides ne peut donc s'expliquer que par une insuffisance dans le pouvoir résolutif de la méthode utilisée.

Il ne semble pas, cependant, qu'aucune autre méthode puisse, en une seule opération, réaliser la séparation d'un aussi grand nombre de peptides.

D'autre part, comme nous avons utilisé un réactif à la ninhydrine relativement dilué (0,1 %), nous ne pouvons révéler que les peptides quantitativement les plus importants. L'utilisation d'un réactif à la ninhydrine plus concentré (1 % par exemple) aurait révélé un nombre bien supérieur de peptides.

Mais dès lors, la multiplicité des taches, leur confluence en certaines zones de l'électrochromatogramme aurait largement gêné l'interprétation des résultats.

Nous avons voulu réserver à la méthode choisie un caractère de simplicité et de reproductibilité tel que nous puissions, par examen visuel direct, déceler les anomalies majeures.

1) *Hydrolysats trypsiques :*

La comparaison des hydrolysats trypsiques de nos 15 paraprotéines permet de retenir quelques constatations intéressantes.

1. - Tous les électrochromatogrammes contiennent à une unité près le même nombre de peptides : 40 ou 41.

2. - Leur répartition d'ensemble aussi bien pour els paraprotéines que pour les γ-globulines normales est comparable. Il n'y a pas de peptides « aberrants ».

3. - Un certain nombre de peptides sont retrouvés dans tous les cas. Ainsi la planche 3 nous montre que 4 peptides basiques, appelés D_1, D_2, D_3 et D_4 sont toujours présents. Il en est de même pour les peptides acides E_1, E_2, E_3, I_1, I_2 qui ne migrent pas en électrophorèse.

De nombreux autres exemples pourraient être cités, en particulier dans les cases B, C, F et J.

4. - Des peptides nouveaux apparaissent dans certaines cartes d'hydrolysats de protéines anormales. La planche 3 en représente trois exemples, où les peptides nouveaux sont représentés en noir. Ils apparaissent surtout dans la zone inter-neutre-basique, dans les limites de Rf (peptide) comprises entre 0 et 0,65 (cases C et G).

5.- Des peptides présents dans les γ-globulines normales peuvent manquer dans les hydrolysats pathologiques.

La planche 4 montre bien que certains peptides des γ normales (en noir sur la carte 1) ne sont pas retrouvés dans les 3 exemples choisis.

6. - Dans la plupart des hydrolysats enfin, il persiste une traînée ne migrant pas en chromatographie, encore colorable à l'amidoschwarz, liée à un résidu protéique non hydrolysé.

2) *Hydrolysats chymotrypsiques :*

La planche 5 représente les électrochromatographies d'hydrolysats chymotrypsiques de γ-globulines normales et de trois protéines myélomateuses.

On constate que dans ces cas, il y a deux fois disparition presque complète de la traînée protéique de Rf (peptide) = 0.

Ici encore la répartition d'ensemble est toujours comparable.

Mais des peptidees nouveaux non identiques à ceux des hydrolysats trypsiques apparaissent dans les hydrolysats pathologiques. Ils se localisent en divers points de la carte avec cependant une certaine prédominance pour la zone neutre (cases B, F, J). De même quelques peptides des γ-globulines normales manquent dans les 3 cas choisis.

3) *Hydrolysats papaïniques :*

Les mêmes résultats sont observables pour les hydrolysats papaïniques. La planche 6 représente quatre d'entre eux. La morphologie d'ensemble des cartes est conservée, des peptides sont communs, par exemple les peptides basiques D_1, D_2, D_3 et les peptides de la zone neutre.

Mais il existe ici encore de nouveaux peptides représentés en sombre sur les cartes 2, 3 et 4 de la planche 6. Leur localisation est très variable et l'on doit remarquer, par exemple, les nombreux peptides acides apparaissant sur la carte 4 (case A).

Des peptides normaux des γ-globulines, manquent aussi dans les hydrolysats pathologiques, par exemple les peptides C_2, C_6, C_7.

La traînée de Rf (peptide) 0 que l'on rencontrait dans les autres types d'hydrolysat est ici beaucoup moins importante, car fractionnée, surtout dans les hydrolysats 2 et 4 de la planche 6.

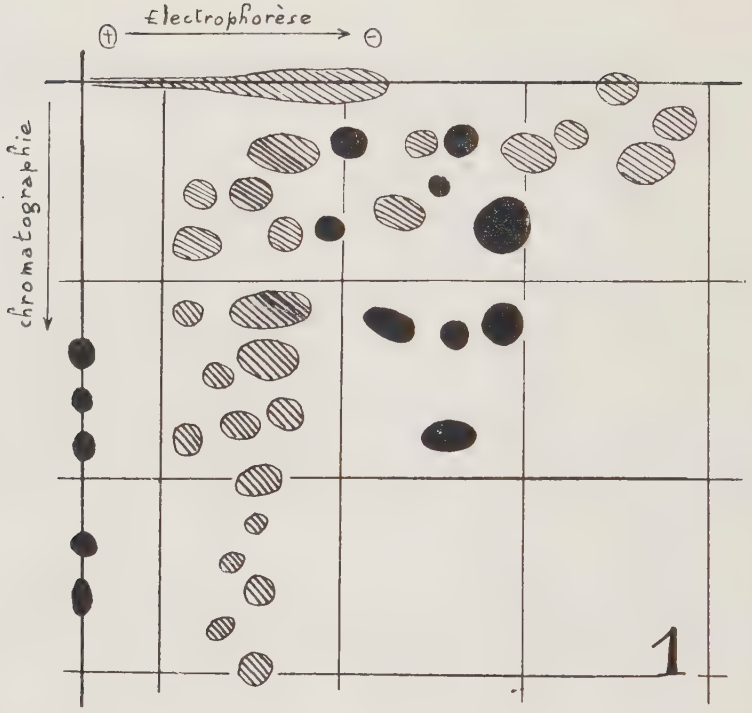
La similitude de ces cartes rapproche l'hydrolyse papaïnique des autres protéolyses malgré le mécanisme différent (réduction) que pourrait réaliser cet enzyme (Nisonoff) (244).

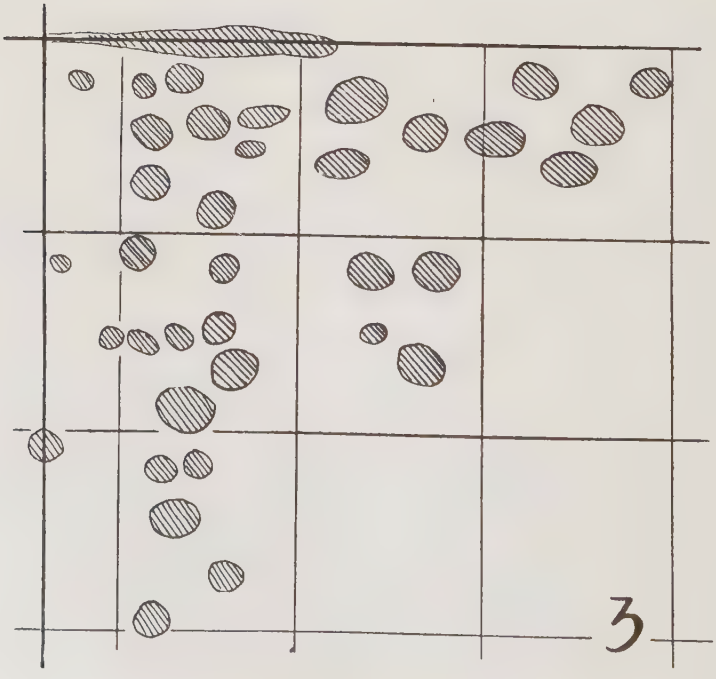
4) *Hydrolysats pepsiques :*

Les hydrolysats pepsiques des protéines myélomateuses sont très différents, sur les cartes électrochromatographiques, des hydrolysats de γ-globulines normales. La planche 7 en représente trois exemples.

— L'élément dominant est la présence de très nombreux peptides nouveaux localisés dans toutes les zones de la feuille. L'apparition de peptides basiques, dans la case D, dans les cases G et H, K et L (n° 2), est très particulière ; elle traduit l'intensité de la dégradation pepsique.

— La traînée de Rf (peptide) 0 est, dans les cas pathologiques, fractionnée ; elle ne prend plus la coloration à l'amidoschwarz,


électrophorèse
⊕
⊖
chromatographie
1


3

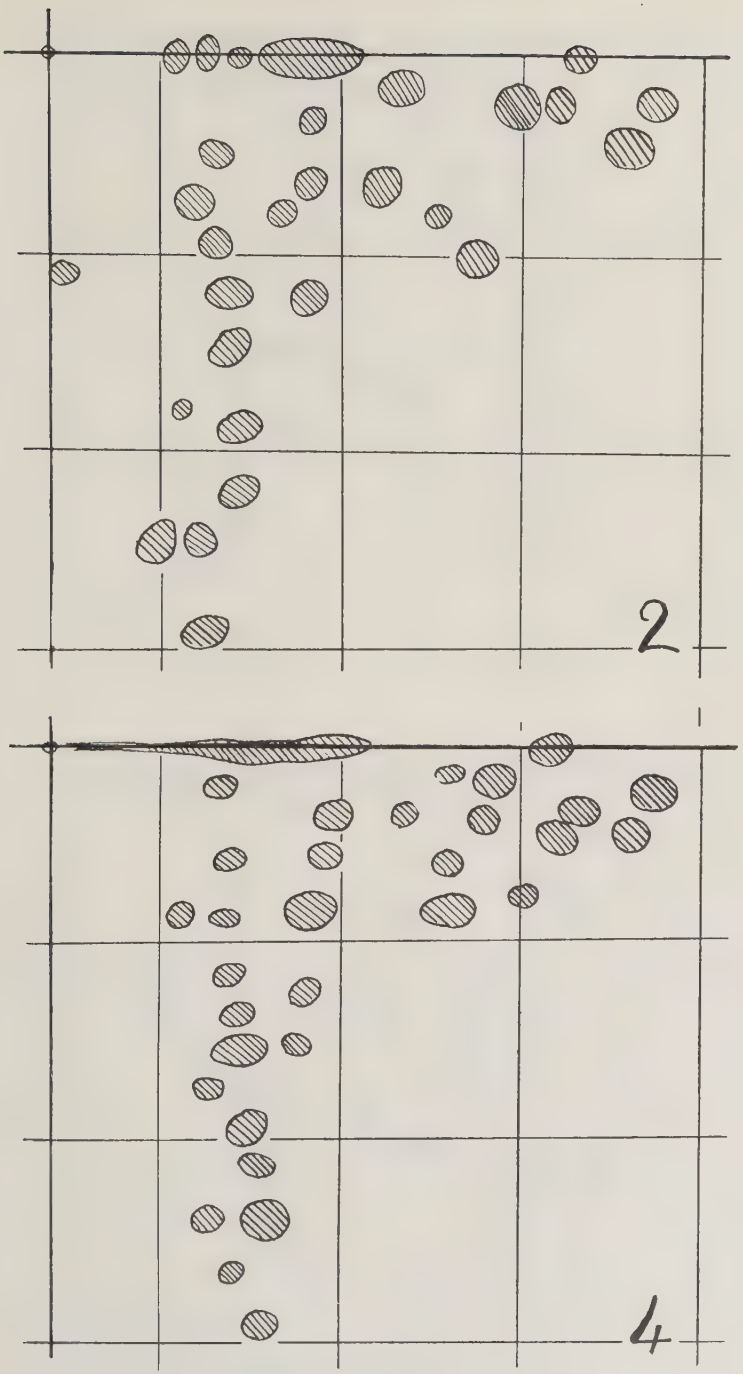
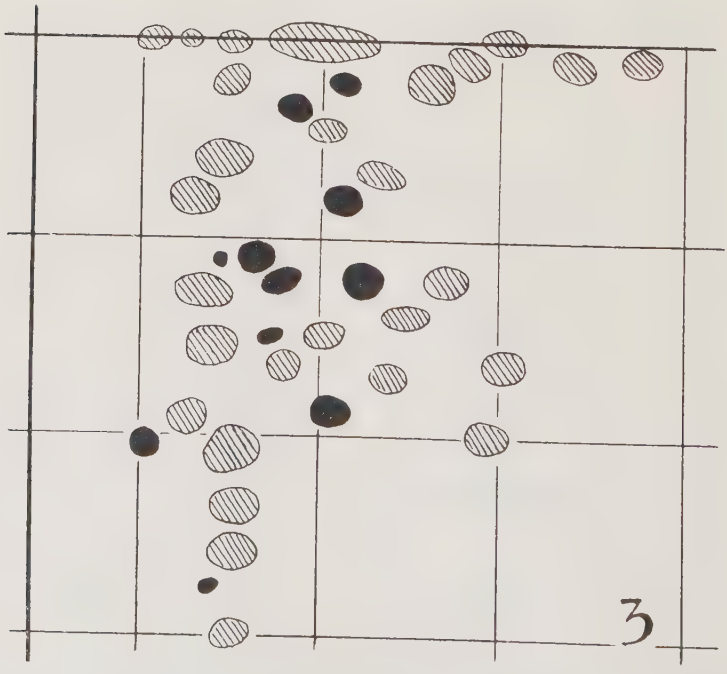
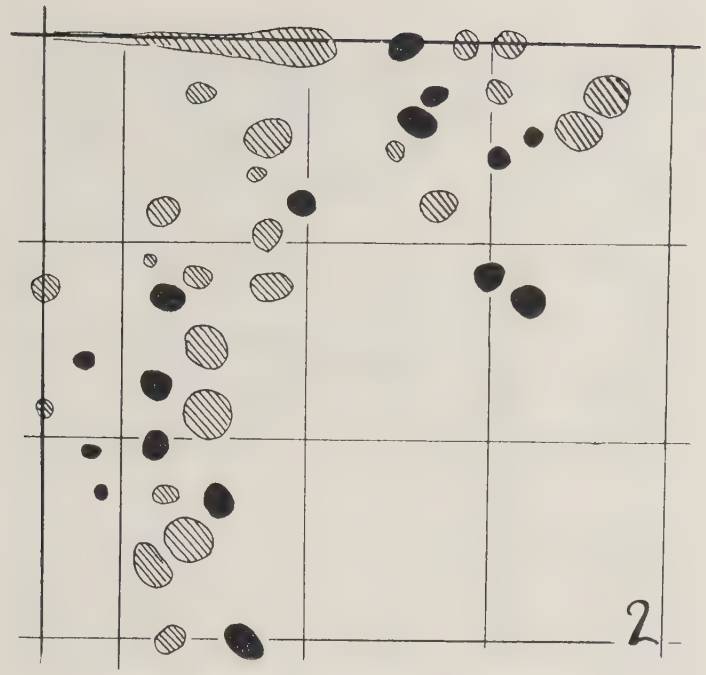


PLANCHE 4. — Cartes électrochromatographiques d'hydrolysats trypsiques. (1) : gamma-globulines normales ; (2) : obs. n° 1 ; (3) : obs. n° 4 ; (4) : obs. n° 12. — En noir les peptides de l'hydrolysat normal non retrouvés dans les hydrolysats de protéines myélomateuses.

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
1


3



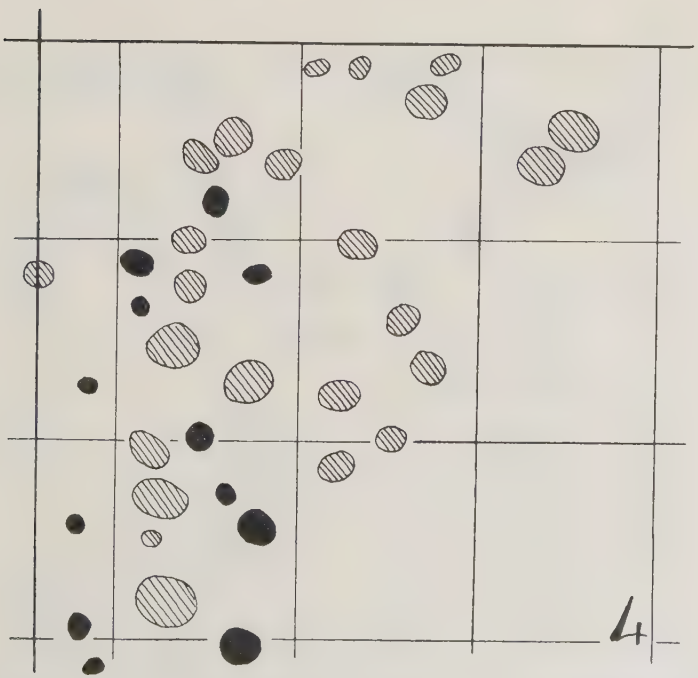
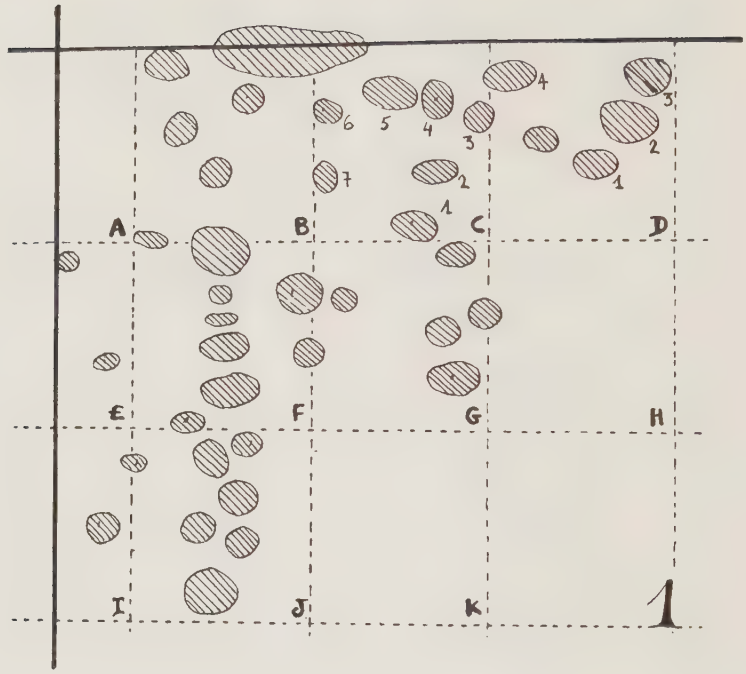


PLANCHE 5. — Cartes électrochromatographiques d'hydrolysats chymotrypsiques. (1) : γ-globulines normales ; (2) : obs. n° 12 ; (3) : obs. n° 15 ; (4) : obs. n° 2. — En noir les peptides nouveaux.


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
1

3

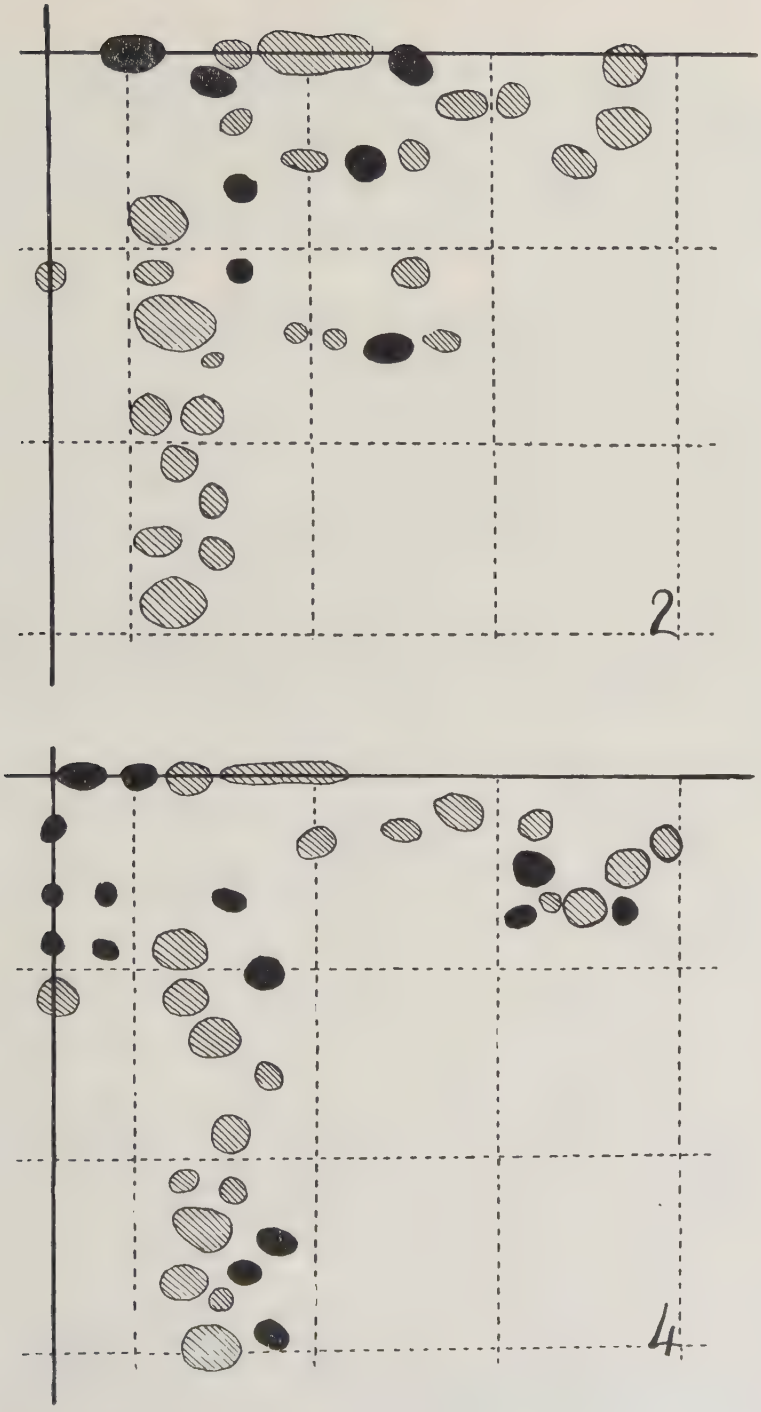


PLANCHE 6. — Cartes électrochromatographiques d'hydrolysats papaïniques. (1) : γ-globulines normales ; (2) : obs. n° 4 ; (3) : obs. n° 3 ; (4) : obs. n° 2.

Certains peptides restent identiques dans les cartes normales et pathologiques. C'est le cas, en particulier, des peptides de la zone neutre (cases B, F, J) et des peptides de la case G.

— De rares peptides normaux enfin sont absents dans les hydrolysats paraprotéiques (peptide B_5, A_1, A_2, par exemple).

5) *Comparaison d'hydrolysats de paraprotéines sériques et de protéines de B. J. :*

Chez certains malades, nous avons pu examiner simultanément la protéine myélomateuse sérique et la protéine urinaire de B. J.

Quelle que soit l'hydrolyse enzymatique réalisée, les cartes obtenues sont toujours très dissemblables.

La planche 8 représente, à titre d'exemple, les hydrolysats trypsiques des protéines sérique et urinaire de deux malades.

Ici encore les répartitions d'ensemble sont similaires mais en examinant en détail chaque zone, on s'aperçoit que le nombre des peptides de la protéine de B. J. est supérieur, qu'il existe des peptides nouveaux en zone inter-neutre basique (n° 2) ou en zone basique (n° 4). De plus la dégradation des protéines de B. J. semble plus complète, la traînée de Rf (peptide) 0 étant toujours absente.

Des peptides communs restent néanmoins présents dans les 2 cas, surtout dans les zones basique et neutre.

6) *Comparaison d'hydrolysats de protéines de Bence-Jones :*

La non-identité des protéines de B. J. entre elles se vérifie bien par la méthode électrochromatographique.

Sur 8 échantillons de ces protéines, nous avons réalisé, comme pour les paraprotéines sériques, les quatre types d'hydrolyse enzymatique.

Parmi toutes les cartes, nous avons choisi de comparer :

- quatre hydrolysats pepsiques de protéines de B. J. différentes (planche 9) ;
- quatre hydrolysats différents d'une même protéine de B. J. (planche 10).

— Les hydrolysats pepsiques de la planche 9 montrent que la morphologie générale des cartes est comparable ; mais l'étude individuelle décèle bien des différences entre chaque hydrolysat. On est frappé ainsi par la richesse de l'échantillon 4 en peptides acides, des échantillons 2 et 3 en peptides inter-neutre-basiques.

— La planche 10 nous montre l'action des divers enzymes sur une même protéine de B. J.

L'aspect général est encore le même mais chaque hydrolysat est caractérisé par des éléments propres : grand nombre de peptides dans l'hydrolysat chymotrypsique, richesse en peptides basiques pour l'hydrolysat papaïnique. Des peptides communs sont cependant toujours présents.

c) *Discussion.*

L'étude électrochromatographique des hydrolysats enzymatiques de protéines myélomateuses, nous permet de constater qu'il existe, dans ces protéines, des différences de structure primaire ; ces différences apparaissent non seulement entre les diverses paraprotéines mais aussi entre celles-ci et les γ-globulines normales. Elles tiennent à la place de certains peptides ou à l'apparition de peptides nouveaux.

Il existe aussi des peptides communs, toujours rencontrés quel que soit l'enzyme employé et quelle que soit la protéine considérée.

Notre type d'expérimentation confirme les résultats d'Hsiao et Putnam (172) (306) qui ont utilisé une autre technique expérimentale, la chromatographie sur résine à pouvoir d'échange ionique, suivant la méthode de Moore et Stein.

Rappelons que ces auteurs, appliquant cette technique au fractionnement des peptides formés par hydrolyse trypsique, ont également mis en évidence des peptides communs et des peptides nouveaux dans les hydrolysats pathologiques.

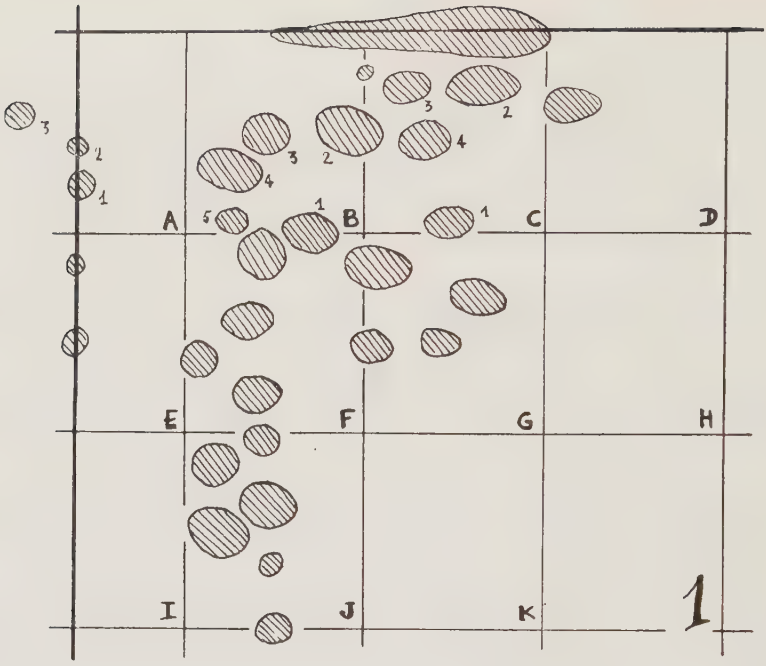
La critique que l'on peut faire à cette expérimentation s'applique aussi à notre travail : il est en effet délicat de comparer des γ-globulines normales, ensemble hétérogène de molécules diverses, à une paraprotéine myélomateuse, très homogène et représentant probablement une perturbation localisée d'un groupe des γ-globulines.

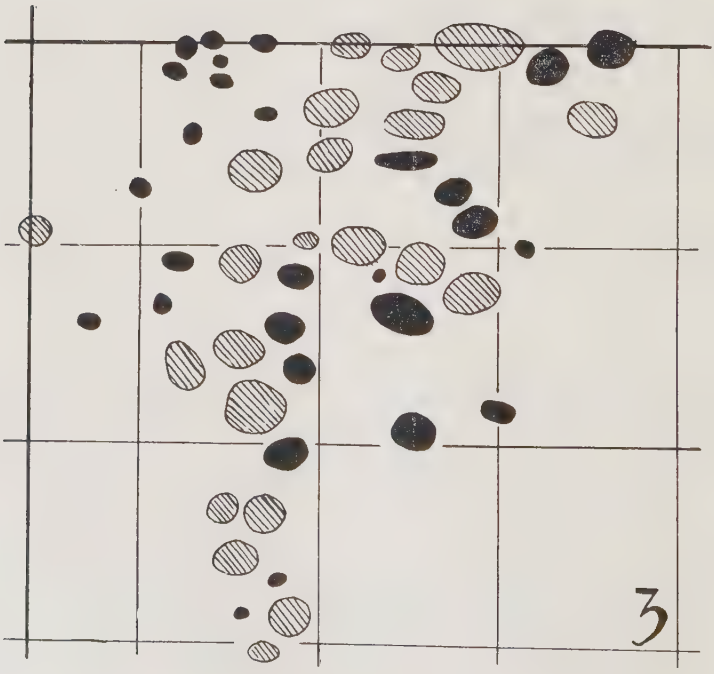
Nous n'avons pu disposer de quantité suffisante de β_{2a}-globuline normale pure, pour comparer ses produits d'hydrolyse à ceux que nous avons obtenus avec la paraprotéine β de l'un de nos malades.

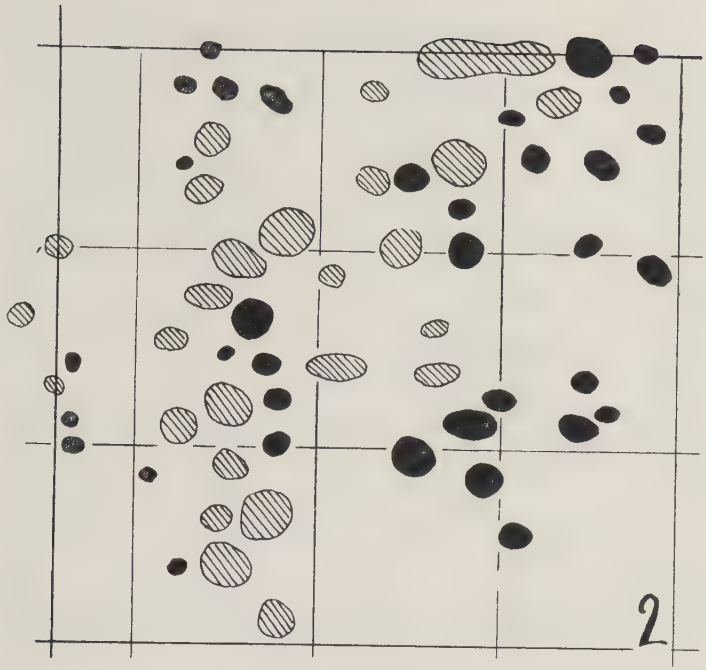
On peut néanmoins conclure :

— que les protéines myélomateuses présentent des parties communes avec les γ-globulines normales ;

— qu'elles ont aussi des particularités de structure individuelles.


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
1


3



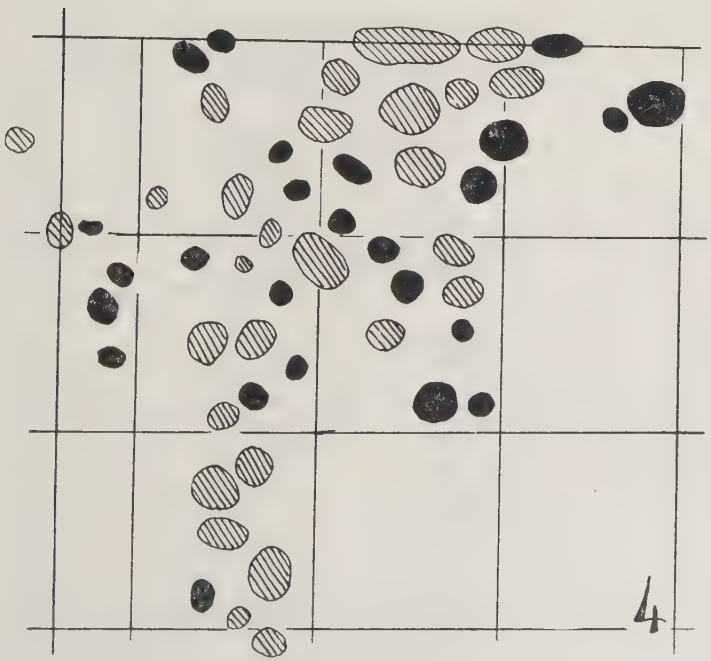
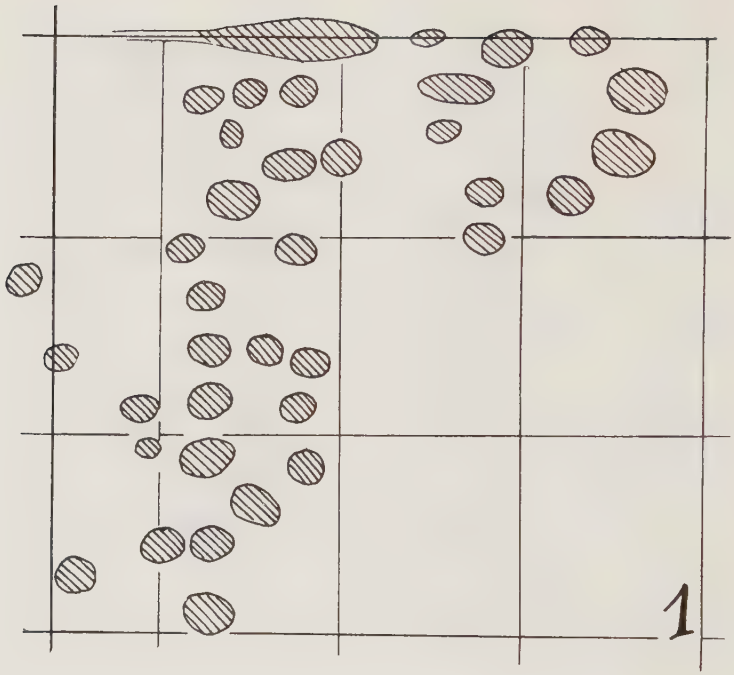
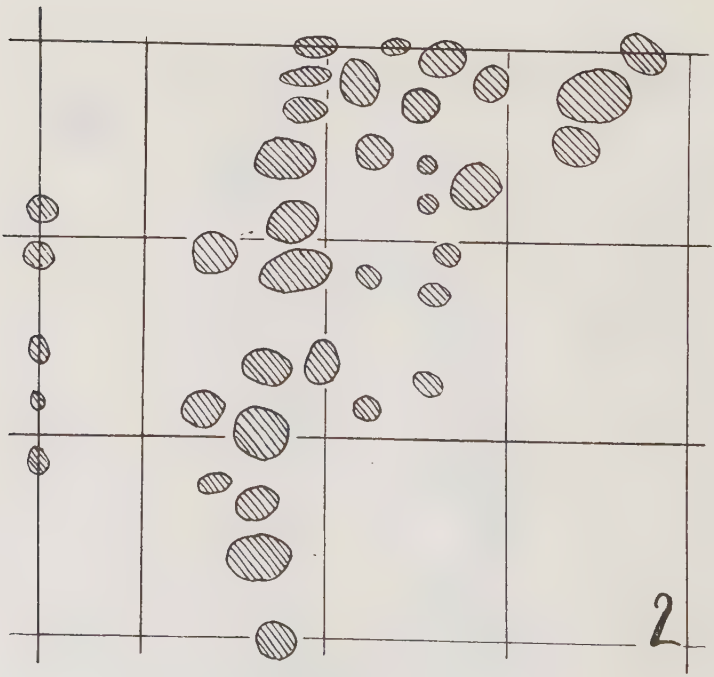


PLANCHE 7. — Cartes électrochromatographiques d'hydrolysats pepsiques. (1) : γ-globulines normales ; (2) : obs. n° 3 ; (3) : obs. n° 7 ; (4) : obs. n° 10. — En noir sont représentés les peptides supplémentaires des hydrolysats pathologiques.


1


2

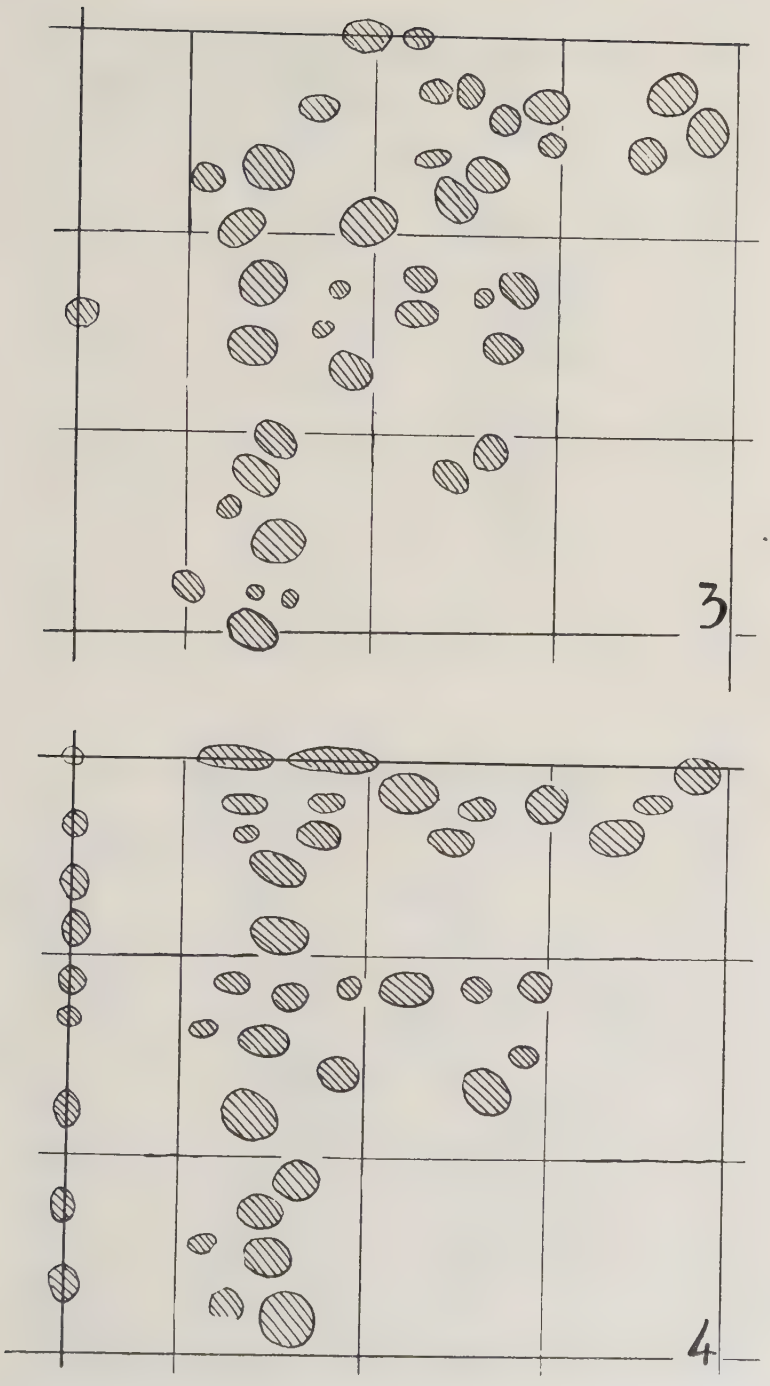
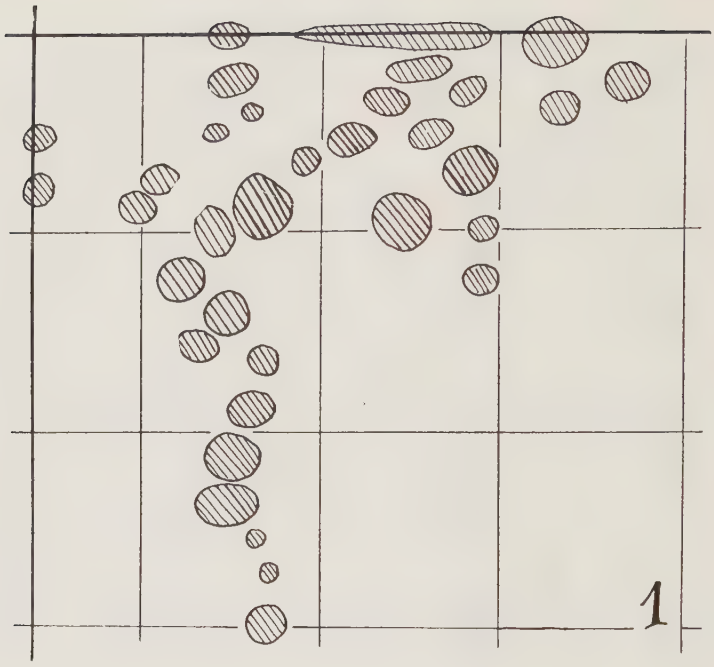


PLANCHE 8. — Etude comparative des cartes électrochromatographiques d'hydrolysats trypsiques des protéines sérique et urinaire de deux malades. — (1) : protéine sérique ; (2) : protéine de B.J. (obs. n° 3) ; (3) : protéine sérique ; (4) : protéine de B.J. (obs. n° 2).


1

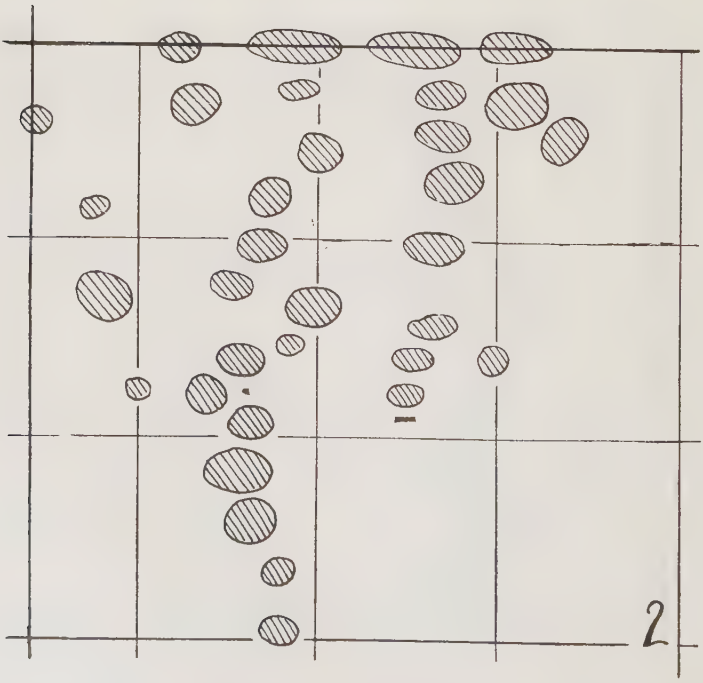
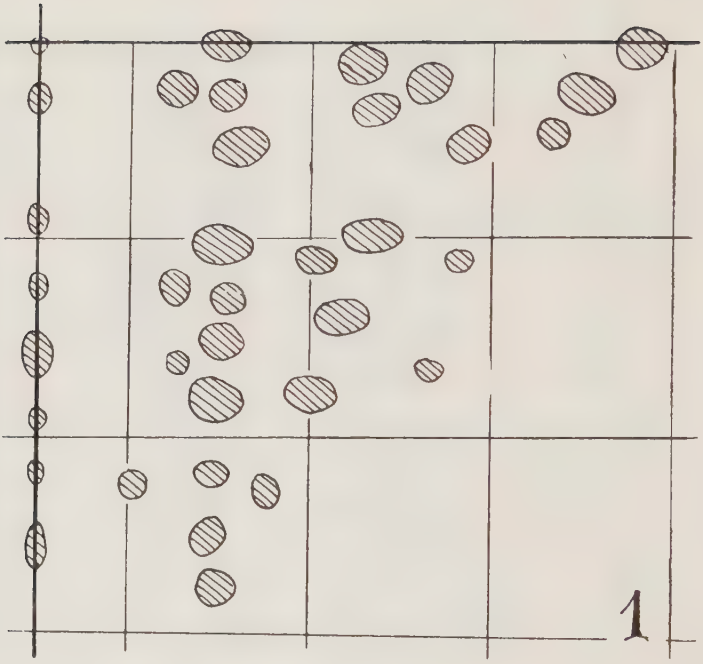

2

PLANCHE 9. — Cartes électrochromatographiques d'hydrolysats pepsiques de diverses protéines de Bence-Jones.


1

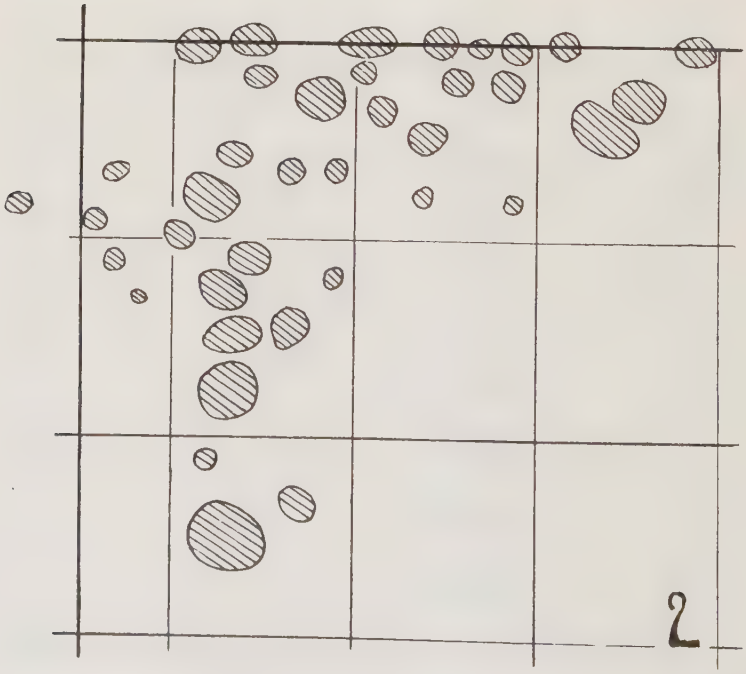

2

PLANCHE 10. — Cartes électrochromatographiques de divers hydrolysats d'une protéine de Bence-Jones (obs. n° 13). — (1) : hydrolysat trypsique; (2) : chymotrypsique ; (3) : papaïnique ; (4) : pepsique.

2) **Etude immunologique des hydrolysats.**

a) *Technique.*

L'immunoélectrophorèse est toujours pratiquée suivant la microméthode de Scheidegger, dans un tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique 0,05.

5 mg d'hydrolysat lyophilisé sont dissous dans 0,1 ml de sérum physiologique et 5 µl déposés dans le godet creusé dans la gélose.

Après le temps électrophorétique, la révélation est faite :

— soit avec un immunsérum polyvalent de l'Institut Pasteur (sérum équin anti-protéines sériques) ;

— soit avec un sérum de lapin anti-γ-globulines préparé avec la fraction II de Cohn ;

— soit enfin avec un sérum de lapin anti-β_{2a}-globulines préparé à partir de lait de femme délipidé et fractionné au sulfate d'ammonium.

b) *Résultats.*

1. γ-globulines normales.

A partir d'une solution commerciale de γ-globulines, nous avons séparé par chromatographie sur DEAE-cellulose, une fraction pure qui a été hydrolysée suivant les techniques déjà décrites.

Après hydrolyse trypsique, nous obtenons, par révélation avec le sérum de lapin anti-γ-globulines, deux arcs de précipitation nets, bien dessinés et symétriques. Leur mobilité électrophorétique est différente et l'on peut donc individualiser un fragment lent (L) et un fragment rapide (R) (figure 31).

Les arcs de précipitation correspondant à ces deux fragments protéiques sont nettement différents, dans leur forme et leur mobilité, de l'arc γ non attaqué dont ils proviennent.

Nous observons la même image immunoélectrophorétique après hydrolyse chymotrypsique et papaïnique.

Dans les trois hydrolysats, l'immunsérum de l'Institut Pasteur (13.417 ou 512) ne révèle par contre qu'un seul arc, le plus rapide.

L'hydrolyse pepsique, dans nos conditions expérimentales, ne donne aucun arc de précipitation quels que soient les antisérums ou les concentrations d'hydrolysat utilisés.

2. - Globulines myélomateuses.

Les analyses immunoélectrophorétiques des protéines myélomateuses de type γ hydrolysées dans les mêmes conditions techniques, fournissent des résultats absolument identiques à ceux des γ-globulines normales, figure 32.

En effet, pour les hydrolysats trypsique, chymotrypsique et papaïnique, nous obtenons toujours :

— deux arcs symétriques de mobilité électrophorétique différente, par révélation avec l'antisérum γ ;

— un seul arc, le plus rapide ,avec l'antisérum polyvalent 13.415 ou 512. Cet arc présente parfois une double concavité, mais il caractérise toujours le fragment (R), figure 33.

Par emploi du sérum anti-γ-globulines, 2 fragments enzymatico-résistants sont toujours présents, à peu près identiques dans leur

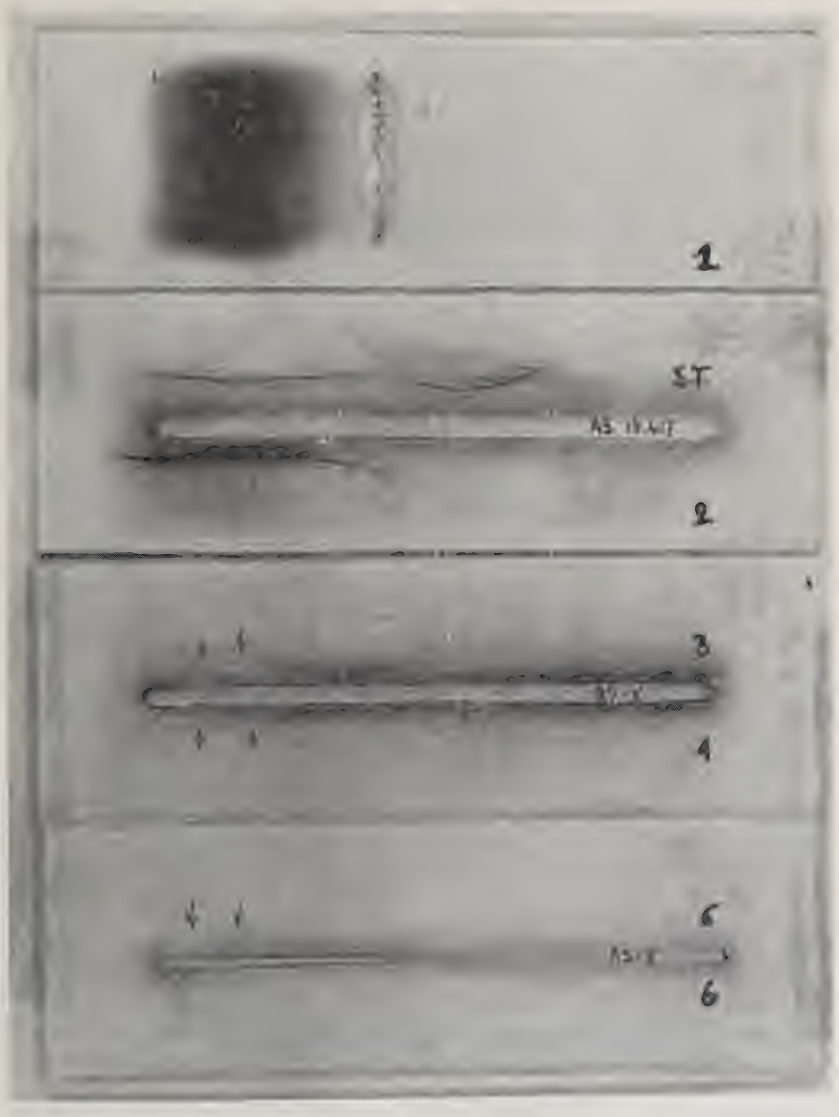


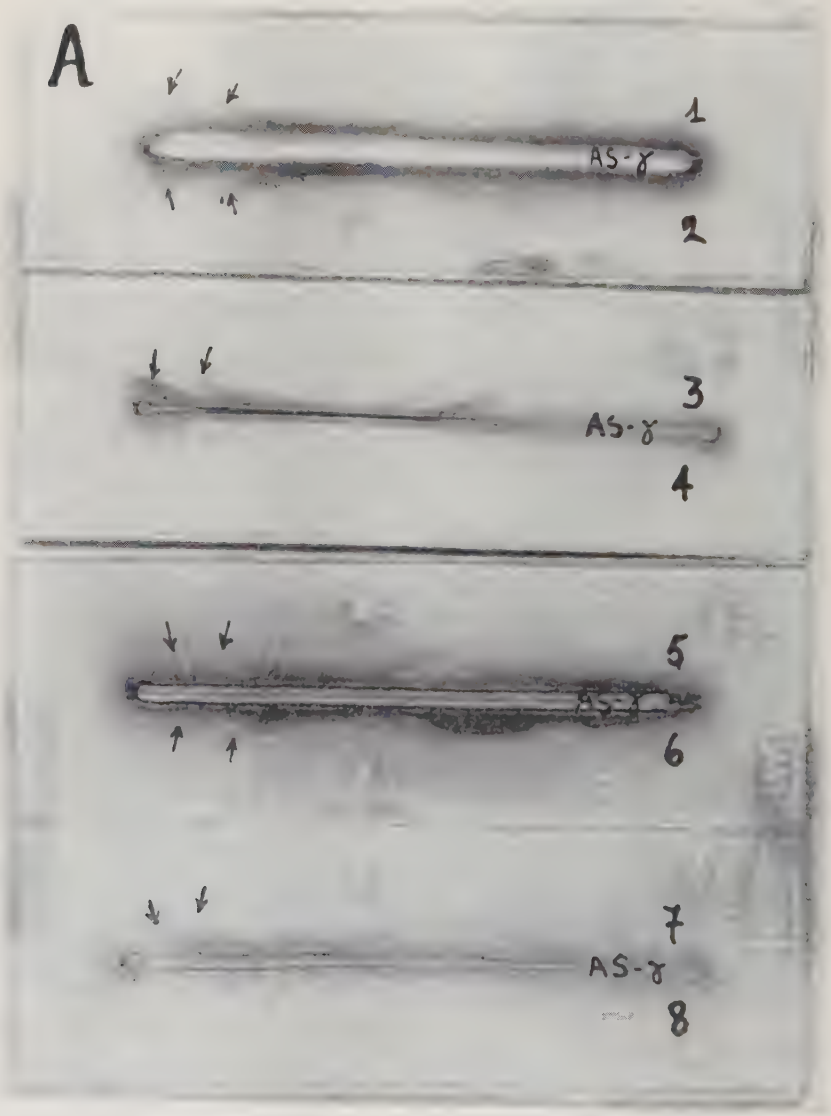
Figure 31. — (1) et (2) : électrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse de la fraction chromatographique T_1 de γ-globulines normales. — (3), (4), (5), (6) : respectivement, hydrolysats trypsique, chymotrypsique, papaïnique et pepsique.

forme et leur vitesse électrophorétique, quelle que soit la mobilité initiale de la protéine myélomateuse et l'enzyme protéolytique utilisé.

Comme pour les γ-globulines normales, nous n'avons jamais observé d'arc de précipitation dans les hydrolysats pepsiques.

c) *Discussion.*

La comparaison de nos résultats avec ceux d'autres auteurs est difficile. En effet, la plupart des travaux consacrés à l'étude immu-



nologique des hydrolysats enzymatiques de γ-globulines, ont été pratiqués soit sur des γ-globulines humaines, le plus souvent normales, rarement pathologiques, soit sur des γ-globulines animales,

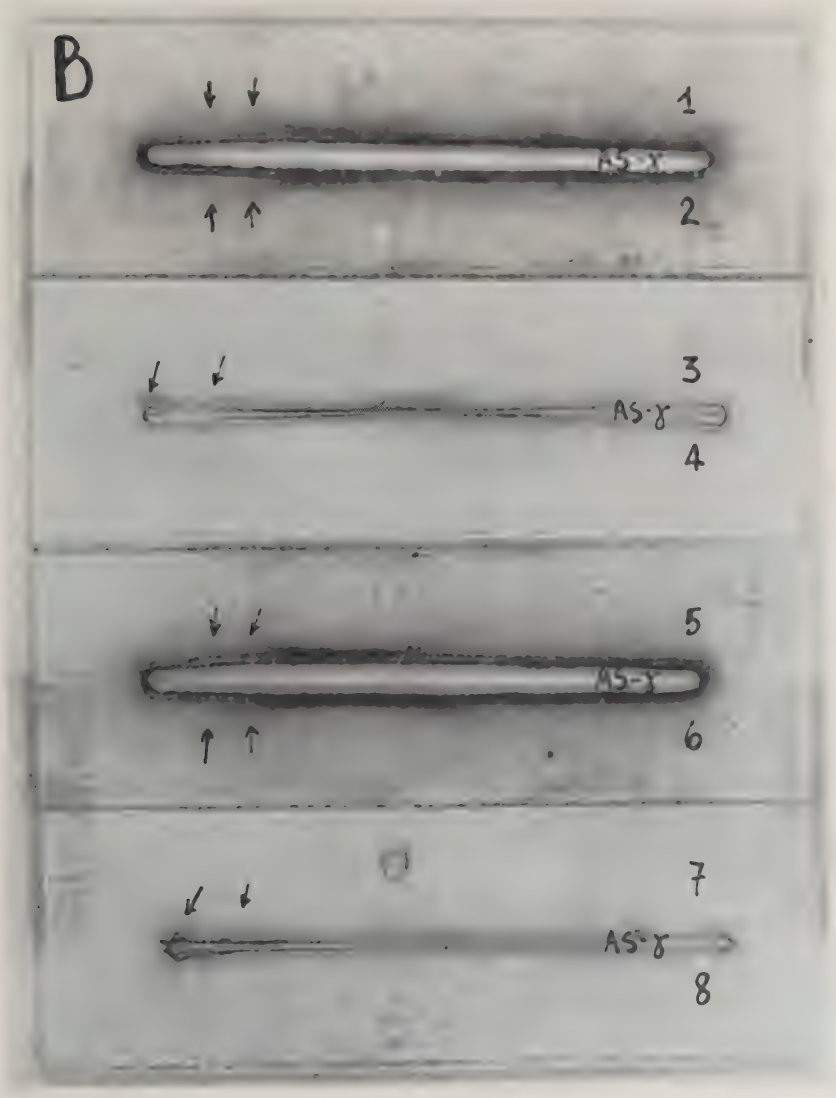


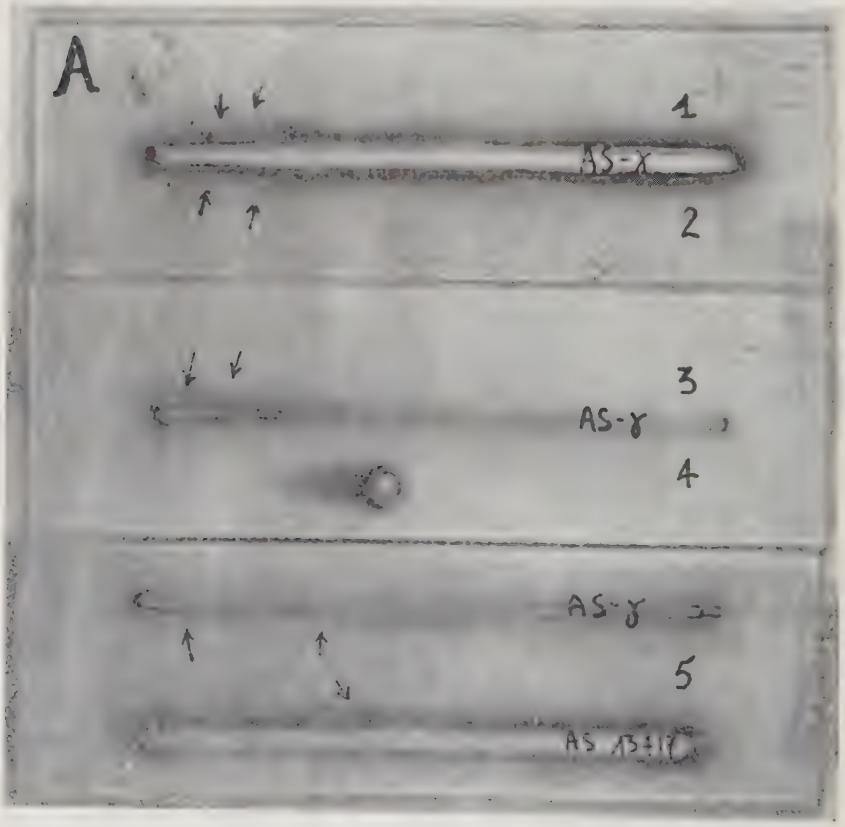
FIGURE 32 A et B. — Images immunoélectrophorétiques de quelques protéines myélomateuses hydrolysées par différents enzymes et révélées par un sérum anti-γ-globulines. (1) et (5) : hydrolysat chymotrypsique ; (2) et (6) : hydrolysat trypsique ; (3) et (7) : hydrolysat papaïnique ; (4) et (8) : hydrolysat pepsique.

soit avec un seul enzyme (papaïne le plus souvent), soit enfin dans des conditions expérimentales très variables.

α) *Résultats analogues.*

Ils ont été obtenus par l'action de la papaïne essentiellement. Stiehm et coll. (358) par analyse pondérale du précipité antigène-anticorps, Edelman et Heremans (94) par immunoélectrophorèse, ont montré que cet enzyme libère au moins deux fragments immunologiquement distincts à partir des γ-globulines humaines. Nous retrouvons, dans notre travail, les fragments (L) et (R) de ces auteurs.

Les travaux de Porter sur des γ-globulines de lapin sont maintenant classiques. La papaïne libère trois fragments dont deux ont conservé des propriétés immunologiques ; ces faits sont encore à rapprocher de nos propres résultats.



Quant aux résultats de Schultze et Schwick (329), ils sont particuliers puisque ces auteurs ont fait agir trypsine et chymotrypsine directement sur le sérum sanguin. Ils ont observé néanmoins en immunoélectrophorèse, un dédoublement des lignes de l'albumine et des γ-globulines.

β) *Résultats différents.*

Ils sont observés par divers auteurs qui tous ont pratiqué les hydrolyses dans des conditions particulières, défavorables.

Il s'agit soit d'une diminution du temps d'action enzymatique, soit de l'utilisation d'un enzyme insoluble (Cebra et coll.) (51), soit d'un abaissement de la température et de la concentration enzymatique (Petermann et Pappenheimer) (272), soit d'une hydrolyse par

Figure 33 A et B. — Différences immunoélectrophorétiques obtenues avec l'anti-sérum humain total et le sérum anti-γ-globulines pour divers hydrolysats de protéines myélomateuses. — A. - (1) : hydrolysat chymotrypsique ; (2) : trypsique ; (3) et (5) : papaïnique. — B. - (1) : hydrolysat trypsique ; (2) : chymotrypsique ; (3) : papaïnique.

la papaïne ou la pepsine à un pH éloigné du pH optimum d'action, suivie d'une réduction (Nisonoff et coll.) (244).

Toutes ces conditions cherchent à obtenir des découpages partiels de la molécule en fragments de poids moléculaire relativement élevé.

Ainsi Nisonoff obtient des poids moléculaires de l'ordre de 55 000, Petermann des valeurs de 90 à 98 000.

Dans ces circonstances, les résultats immunologiques sont au second plan et d'ailleurs très différents ; Nisonoff, par exemple, obtient une précipitation antigène-anticorps après action de la pepsine.

Nos expériences sont plus complètes que les précédentes puisqu'elles ont porté à la fois sur des γ-globulines normales et myélomateuses et sur trois types d'hydrolyse enzymatique : trypsique, chymotrypsique et papaïnique.

Elles nous permettent de souligner l'identité des images immunoélectrophorétiques de divers hydrolysats, aussi bien dans les γ-globulines normales que myélomateuses.

Les 2 arcs obtenus correspondent à 2 fragments enzymatico-résistants ayant conservé des motifs antigéniques des γ-globulines.

Ils sont indépendants de la mobilité électrophorétique de la protéine anormale envisagée et ils sont constants quel que soit l'enzyme utilisé.

L'identité immunologique observée n'implique cependant pas une identité chimique totale. Elle prouve simplement que les « lieux actifs » vis-à-vis des anticorps anti-γ de lapin sont intacts. Mais il faut admettre que la spécificité de chaque enzyme n'intervient pas pour l'obtention de ces fragments immunologiquement actifs.

En résumé, nos expériences d'hydrolyse enzymatique de protéines myélomateuses nous ont permis :

— de comparer, par une technique électrochromatographique, les peptides libérés ;

— d'étudier, en immunoélectrophorèse, les fragments non détruits par les enzymes.

Elles apportent essentiellement, comme fait original, l'identité des images immunoélectrophorétiques dans tous les types de γ-globulines myélomateuses après hydrolyses trypsique, chymotrypsique et papaïnique.

Conclusion

Nous avons, dans notre étude, envisagé plusieurs caractères biochimiques des protéines anormales du myélome multiple :

Après fractionnement des sérums sur DEAE-cellulose pour obtenir des substrats purs, nous avons abordé :

A) Les problèmes de structure :

— par détermination des groupes N-terminaux ;

— par électrochromatographie des hydrolysats enzymatiques.

B) L'étude immunologique des produits d'hydrolyse.

A) **Structure.**

1° la détermination des groupements aminés terminaux nous a montré :

— l'apparition possible d'acides aminés aberrants en position N-terminale (leucine par exemple) ;

— la présence, le plus souvent, des mêmes acides aminés terminaux que dans les gamma-globulines normales ; les proportions respectives d'acide aspartique et d'acide glutamique s'écartent cependant des taux normaux.

2° L'étude électrochromatographique des hydrolysats trypsiques, chymotrypsiques, papaïniques et pepsiques de protéines myélomateuses révèle :

— une structure générale identique dans tous les cas ;

— des différences de détail dans le nombre, la situation, l'importance des peptides de chaque paraprotéine. Aucune n'est identique à une autre ; aucune n'est identique aux γ-globulines normales. Des peptides nouveaux apparaissent, des peptides présents dans l'hydrolysat normal manquent souvent.

Pour le groupe des protéines de Bence-Jones, les électrochromatographies montrent que ces protéines sont très dissemblables entre elles et qu'elles sont aussi différentes des paraprotéines sériques.

D'ailleurs, les expériences isotopiques, qui ont démontré que la biosynthèse de la protéine de Bence-Jones et celle des protéines

myélomateuses sériques étaient totalement indépendantes, sont suffisamment significatives pour considérer ces protéines comme des molécules autonomes.

B) **Etude immunologique.**

Les immunoélectrophorèses des hydrolysats trypsiques chymotrypsiques et papaïniques montrent dans tous les cas deux arcs distincts, provenant de la dissociation de l'arc gamma initial. Ils sont symétriques, identiques, quels que soient la globuline normale ou pathologique envisagée et le type d'enzyme choisi.

Les données que nous apportons confirment bien les notions actuelles sur la structure des γ-globulines myélomateuses qui comportent probablement :

— une partie résistant à la protéolyse, hétérogène, contenant au moins deux fragments immunologiquement actifs ;

— une partie que l'hydrolyse scinde en peptides de faible poids moléculaire. Leur libération montre des différences marquées suivant les diverses globulines myélomateuses étudiées et suivant l'enzyme protéolytique utilisé.

Nous confirmons donc l'idée de PUTNAM, que la structure primaire de ces peptides est différente de celle des peptides correspondants des γ-globulines normales.

Les protéines myélomateuses ont, en définitive, de nombreux points communs avec les γ-globulines normales. Elles ont aussi quelques caractères aberrants qui renforcent l'idée que le myélome plasmocytaire est une maladie moléculaire des gamma-globulines.

VU : *Le Président de Thèse,*

MERIEL.

VU : *Le Doyen,*

LAZORTHES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Toulouse, le 29 mars 1962

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

DOTTIN.

Bibliographie

1. Abderhalden (E.) et Rostoski (O.). — Beitrag zur Kenntnis des Bence-Jones'schen Eiweisskœrpers. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1905, *46*, 125-135.

2. Abrams (W. S.), Cohen (P. P.) et Meyer (O. O.). — The physical properties of a cryoglobulin obtained from lymph nodes and serum of a case of lymphosarcoma. *J. Biol. Chem.*, 1949, *181*, 237-245.

3. Adams (W. S.), Alling (E. L.) et Lawrence (J. S.). — Multiple myeloma ; its clinical and laboratory diagnosis with emphasis on electrophoretic abnormalities. *Am. J. Med.*, 1949, *6*, 141-161.

4. Adams (W. S.), Mason (E. D.) et Bassett (S. H.). — Metabolic balance investigation of three cases of multiple myeloma during ACTH administration. *J. Clin. Invest.*, 1954, *33*, 103-121.

5. Adner (P. L.), Wallenius (G.) et Werner (I.). — Macroglobulinemia and myelomatosis. *Acta Med. Scand.*, 1960, *168*, 431-437.

6. Agren (G.). — The amino-acid composition of Bence-Jones protein. *Acta Chem. Scand.*, 1952, *6*, 1232-1236.

7. Amano (S.) et Hanaoka (M.). — Experimental « in vitro » production of protein inclusion in plasma cells. *Acta Haemat. Jap.*, 1956, *19*, 205-217.

8. Amano (S.). — Progrès dans l'étude des plasmocytes (genèse, fonction et cytologie) effectués par les hématologistes japonais entre 1941 et 1956. *Le Sang*, 1957, *8*, 753-775.

9. Anker (H. S.). — The biosynthesis of plasma proteins, in Putnam F. W., *The Plasma Proteins*, vol. 2, pp. 296-301, Academic Press, New-York, 1960.

10. Apitz (K.). — Die Paraproteinosen. Ueber die Stœrung des Eiweiss-stoffwechsels bei Plasmocytom. *Virchow's Arch. Path. Anat. und Physiol.*, 1940, *306*, 631-699.

11. Ardry (R.). — Fractionnement des protéines plasmatiques. *Biol. Méd.*, 1955, *44*, 662-766.

12. Askonas (B. A.). — A study on globulin formation by plasmacel neoplam (5563) transplantable in mice. *Biochem. J.*, 1961, *79*, 33-43.

13. Askonas (B. A.) et Fahey (J. L.). — An investigation of closely related gamma-myeloma proteins and normal mouse gammaglobulin by partial enzymic degradation and starch gel electrophoresis. *Nature*, 1961, *190*, 980-983.

14. Askonas (B. A.) et Fahey (J. D.). — Formation of Bence-Jones protein and myeloma proteins in vitro by the plasma cell tumour MPC-2. *Biochem. J.*, 1961, *80*, 261-268.

15. Askonas (B. A.). — Formation of globulins by plasma cell tumours transplantable in mice, in Harris R. J., *Protein Biosynthesis*, pp. 363-379, Academic Press, London, 1961.

16. Atamer (M. A.) et Dietz (A. A.). — Alpha-2 type multiple myeloma. *J. Lab. Clin. Med.*, 1960, *56*, 44-49.

17. Azar (H. A.), Hill (W. T.) et Osserman (E. G.). — Malignant lymphoma and lymphatic leukemia associated with myeloma type serum proteins. *Am. J. Med.*, 1957, *23*, 239-249.

18. Baars (H.). — *Variability of paraproteins in myelomatosis*, Schotanus et Jens, Utrecht, 1955.

19. Batts (M.). — Multiple myeloma ; a review of 40 cases. *Arch. Surg.*, 1939, *39*, 807-823.

20. Baynes-Jones (S.) et Wilson (D. W.). — Immunological relations of Bence-Jones proteins. I. Differences between Bence-Jones proteins and human serum proteins. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1922, *33*, 37-43, et II. Differences between Bence-Jones proteins from various sources, *ibid*, 119-125.

21. Bayrd (E. D.) et Heck (F. J.). — Multiple myeloma. A review of 83 proved cases. *J. Am. Med. Assoc.*, 1947, *133*, 147-157.

22. Bergot (J.), Charmot (G.), Depoux (R.), Orio (J.), Ravisse (P.), Reynaud (R.) et Vargues (R.). — Recherches cliniques sur les gamma-euglobulines. (Description de 20 cas d'hypergammaeuglobulinémie avec 5 cas de macroglobulinémie). *Path. Biol.*, 1958, *6*, 1883-1902.

23. Beare (R. L.) et Knudsen (E. T.). — Atypical multiple myelomatosis. *Brit. Med. J.*, 1956, *II*, 1526-1527.

24. Bernard (A.), Paget (M.), Bera (J.), Henninot (E.) et Samain (J.). — Contribution à l'étude des myélomes plasmocytaires. *Semaine Hôp.*, 1946, *22*, 2136-2147.

25. Bernard (J.). — *Maladies du sang*, pp. 397-413, Flammarion, Paris, 1948.

26. Bernard (J.) et Seligmann (M.). — Myélomes et dysglobulinémies. *Rev. Praticien*, 1959, *9*, 1717-1720.

27. Berson (S. A.) et Yalow (R. S.). — Serum protein turnover in multiple myeloma. *J. Lab. Clin. Med.*, 1957, *49*, 386-394.

28. Bing (J.). — Further investigations on hyperglobulinemia. (Is serum globulin formed from plasma-cells and reticuloendothelial cells ?) *Acta Med. Scand.*, 1940, *103*, 565-583.

29. Biserte (G.) et Osteux (R.). — La chromatographie de partage sur papier des dinitrophényl-amino-acides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, *33*, 50-63.

30. Biserte (G.). — Protéines et maladie de Kahler, *Cancérologie*, 1955, 2, 109-122, et A propos des dysglobulinémies ; leurs rapports avec le myélome multiple. *Ibid.*, 153-162.

31. Biserte (G.) et Dautrevaux (M.). — Les méthodes de détermination des groupes terminaux libres des polypeptides et des protéines. Proc. 3rd Colloquium Bruges, 1955, pp. 163-176, Elsevier, Amsterdam, 1956.

32. Biserte (G.), Boulanger (P.) et Paysant (P.). — Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des milieux biologiques. VI. Tissus normaux et pathologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, *40*, 2067-2089.

33. Biserte (G.), Havez (R.) et Laturaze (J.). — Hétérogénéité électrophorétique et chromatographique des γ-globulines. *C. R. Soc. Biol*, 1960, *154*, 132-136.

34. Biserte (G.). — Les cryoglobulinémies. *Ann. Biol. Clin.*, 1961, *19*, 265-287.

35. Biserte (G.), Laturaze (J.) et Havez (R.). — Applications de la chromatographie sur DEAE-cellulose à l'étude des protéines du sérum sanguin. I. Généralités techniques sur le fractionnement chromatographique des protéines sériques sur celluloses à pouvoir d'échange ionique. *Path. Biol.*, 1961, *9*, 1673-1680.

36. De Boissezon (J. F.). — Etude de quelques cas de dysprotéinémie par l'association de l'immunoélectrophorèse et de l'électrophorèse en gel d'agar-agar. *Thèse Méd.* Toulouse, 1959, N° 55.

37. Bollet (A. J.). — The hexosamine content of the serum globulins in normal and pathological serums. *J. Clin. Invest.*, 1957, *36*, 51-58.

38. Boudin (G.), Barbizet (J.) et Dalloz (J. C.). — Cryoglobulinémie et lymphoréticulosarcome. *Presse Méd.*, 1959, *67*, 594-597.

39. Boulanger (P.), Polonovski (J.), Tayeau (F.), Mandel (P.) et Biserte (G.). — *Biochimie Médicale*, 6e édition, pp. 761-771, Masson, Paris, 1961.

40. Brachfeld (J.) et Myerson (R. M.). — Pyroglobulinemia : diagnostic in myeloma. *J. Am. Med. Assoc.*, 1956, *161*, 865-866.

41. Braunsteiner (H.) et Sailer (S.). — Lymphatische Leukæmie mit Makroglobulinæmie Waldenstrœm. *Acta Haemat.*, 1960, *23*, 306-308.

42. De Brux (J.). — Les myélomes. Etude histo-biologique. *Rev. Rhumat.*, 1949, *16*, 394-402.

43. Burstein (M.) et Fine (J. M.). — Sur le taux des β-lipoprotéines dans les myélomes et la macroglobulinémie de Waldenstrœm. *Rev. Hémat.*, 1959, *14*, 380-383.

44. Burtin (P.), Hartmann (L.), Fauvert (R.) et Grabar (P.). — Etude des critères d'identification de la protéine de Bence-Jones. Valeur de la méthode immunochimique. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, *241*, 339-341.

45. Burtin (P.), Hartmann (L.), Fauvert (R.) et Grabar (P.). — Etude sur les protéines du myélome. I. Etude critique des techniques d'identification de la protéine de Bence-Jones et de leur valeur diagnostique. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1956, *1*, 17-28.

46. Burtin (P.), Hartmann (L.), Heremans (J.), Scheidegger (J. J.), Westendorp-Boerma (F.), Wieme (R.), Wunderly (C.), Fauvert (R.) et Grabar (P.). — Etudes immunochimiques et immunoélectrophorétiques des macroglobulinémies. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1957, *2*, 161-177.

47. Burtin (P.). — Etude immunochimique des macroglobulines et des cryoglobulines, in *Protides of the Biological Fluids* (Proc. 5th Colloquium Bruges 1957), pp. 178-183, Elsevier, Amsterdam, 1958.

48. Bussard (A.) et Perrin (D.). — Electrophoresis in agar plates. *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, *46*, 689-701.

49. Caputo (A.). — N and C terminal groups of highly purified Bence-Jones protein. *Clin. Chim. Acta*, 1959, 4, 545-548.

50. Carnot (P.), Benard (H.), Caroli (J.) et Kayser (F.). — Contribution à l'étude du métabolisme des protides au cours du myélome multiple. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1937, *53*, 206-215.

51. Cebra (J. J.), Givol (D.), Silman (H. I.) et Katchalski (E.). — A two-stage cleavage of rabbit γ-globulin by a water-insoluble papain preparation followed by cysteine. *J. Biol. Chem.*, 1961, *236*, 1720-1725.

52. Chadbourn (W. A.) et Zinneman (H. H.). — Serum electrophoretic pattern and morphology of myeloma cells. *Blood*, 1955, *10*, 1109-1119.

53. Charmot (G.). — Les macroglobulinémies. *Marseille Méd.*, 1959, *96*, 125-142.

54. Charmot (G.) et André (L. J.). — Les cryoglobulinémies. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1959, *4*, 1060-1070.

55. Charvillat (L.). — Contribution à l'étude biochimique du myélome multiple et des dysprotéinémies. *Thèse Méd.*, Lyon, 1955, N° 264.

56. Clausen (J.), Heremans (J.), Heremans (M. T.) et Rask-Nielsen (R.). — Immunoelectrophoretic studies of serum from mice carrying two transplantable plasma-cell leukemias. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1959, *22*, 57-81.

57. Cohn (M.), Deutsch H. F.) et Wetter (L. R.). — Biophysical studies of blood plasma proteins. XIII. Analysis of immunological heterogeneity of human gamma globulin fractions. *J. Immunol.*, 1950, *64*, 381-395.

58. Collier (F. C.), Reich (A.) et King (J. W.). — Multiple myeloma. A report of four cases demonstrating Bence-Jones proteinemia found during routine complement-fixation tests. *New England J. Med.*, 1951, *245*, 969-971.

59. Collier (F. C.), Reich (A.) et King (J. W.). — Value of precipitin tests for Bence-Jones protein, in early diagnostic. *New England J. Med.*, 1952, *247*, 60-62.

60. Collier (F. C.) et Jackson (P.). — Precipitin test for Bence-Jones protein. *New England J. Med.*, 1953, *248*, 409-414.

61. Conn (H. O.) et Klatskin (G.). — Filter paper electrophoretic patterns of serum proteins in multiple myeloma. *Am. J. Med.*, 1954, *16*, 822-832.

62. Cooke (K. B.), Tombs (M. P.), Weston (R. D.), Souter (F.) et Mac Lagan (N. F.). — The chromatography of serum proteins on cellulose ion exchange columns. *Clin. Chim. Acta*, 1959, *4*, 779-783.

63. Cooper (G. R.). — Electrophoretic and ultracentrifugal analysis of normal human serum. in Putnam (F. W.), *The Plasma Proteins*, vol. 1, pp. 51-92, Academic Press, New-York, 1960.

64. Coste (F.), Delbarre (F.), Tissier (M.) et Sors (C.). — Un cas de cryptoleucose à plasmocytes avec altérations osseuses et diffusion très importante du processus plasmocytaire. Les rapports entre myélome multiple et leucose à plasmocytes. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1948, *64*, 359-361.

65. Creyssel (R.), Charvillat (L.), Morel (P.), Matray (F.), de Mendes et Croizat (P.). — Contribution à l'étude biochimique du myélome multiple et des dysprotéinémies malignes. *Rev. Lyon Méd.*, 1956, *5*, 129-171.

66. Creyssel (R.), Morel (P.), Vieux (R.), Pichat (A.), Croizat (P.) et Revol (L.). — L'électrophorèse du sérum au cours des hémopathies malignes. *Le Sang*, 1957, *28*, 34-60.

67. Creyssel (R.), Morel (P.), Fayolle (J.), Carraz (M.) et Coulon (P.). — Contribution à l'étude de la macroglobulinémie de Waldenstrœm. (A propos de 8 observations). *Path. Biol.*, 1957, *5*, 2059-2074.

68. Creyssel (R.) et Fine (J. M.). — Application de l'électrophorèse en gel d'amidon à l'étude des anomalies sériques du myélome multiple et de la macroglobulinémie. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1958, *3*, 984-986.

69. Creyssel (R.), Cille (Y.), Coulon (P.) et Morel (P.). — Etude statistique de quelques caractères des protéines sanguines et urinaires au cours du myélome multiple. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, *40*, 469-483.

70. Creyssel (R.), Fine (J. M.) et Morel (P.). — Etude biochimique de quelques formes atypiques de dysprotéinémies. *Rev. Hémat.*, 1959, *14*, 238-249.

71. Croizat (P.) et Creyssel (R.). — Les troubles des protéines du sérum dans les hémopathies malignes. *Rev. Praticien*, 1961, *11*, 587-596.

72. Crokaert (R.), Verbruggen (H.) et Bigwood (E. J.). — Protéines de Bence-Jones et γ-globulines. *Colloques sur les acides aminés*, Masson, Paris, 1954.

73. Cummings (A. J.). — Unusual urine protein in myelomatosis. *Lancet*, 1957, *273*, 598.

74. Dautrevaux (M.) et Biserte (G.). — Identification des acides aminés « COOH-terminaux » des chaînes peptidiques par chromatographie sur papier des 2-thiohydantoïnes. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, *240*, 1153-1155.

75. Delbarre (F.). — Recherches biochimiques sur la maladie de Kahler. (A propos de l'étude humorale de 22 cas.) *Sem. Hôp.*, 1949, *25*, 2687-2698.

76. Delbarre (F.). — Le myélome multiple des os ou maladie de Kahler. Etude clinique et biologique. *Thèse Méd.*, Paris, 1951, n° 1033.

77. Dent (C. E.) et Rose (G. A.). — The Bence-Jones protein of multiple myelomatosis. Its methionine content and its possible significance in relation to the aetiology of the disease. *Biochem. J.*, 1949, *44*, 610-618.

78. Deutsch (H. F.), Alberty (R. A.) et Gosting (L. J.). — Biophysical studies of blood plasma protein ; separation and purification of new globulin from human blood protein mixtures. *J. Biol. Chem.*, 1946, *165*, 21-35.

79. Deutsch (H. F.). — The immunochemical reactions of human sera with γ_2-globulin antisera. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, *49*, 356-367.

80. Deutsch (H. F.). — Purification and physicochemical properties of an unusual Bence-Jones protein. *J. Biol. Chem.*, 1955, *216*, 97-102.

81. Deutsch (H. F.), Kratchovil (C. H.) et Reif (A. E.). — Immunochemical relation of Bence-Jones proteins to normal serum proteins. *J. Biol. Chem.*, 1955, *216*, 103-111.

82. Deutsch (H. F.) et Morton (J. I.). — Dissociation of human serum macroglobulins. *Science*, 1957, *125*, 600-601.

83. Deutsch (H. F.) et Morton (J. I.). — Human serum macroglobulins and dissociation units. I. Physicochemical properties. *J. Biol. Chem.*, 1958, *231*, 1107-1118.

84. Deutsch (H. F.) et Greenwood (F. C.). — Molecular transformation of macroglobulins. *Federation Proc.*, 1960, *19*, 334.

85. Deutsch (H. F.), Stiehm (E. R.) et Morton (J. I.). — Action of papain on human serum globulins. *J. Biol. Chem.*, 1961, *236*, 2216-2222.

86. Devine (J.). — An analysis of Bence-Jones protein. *Biochem. J.*, 1941, *35*, 433-445.

87. Diguglielmo (R.). — *I plasmocitomi*. Abruzzini, Rome, 1955.

88. Dische (Z.) et Gabriel (O.). — Preparation of two different glycopeptide fractions from human γ-globulin. *Federation Proc.*, 1960, *19*, 147.

89. Drèze (A.). — Les acides aminés terminaux de quelques échantillons de protéines de Bence-Jones. *Clin. Chim. Acta*, 1958, *3*, 89-91.

90. Duret (R. L.). — La macroglobulinémie et ses rapports avec la myélomatose. *Acta Clin. Belg.*, 1956, *11*, 540-554.

91. Dustin (J. P.) et Vis (H.). — A propos des protéinuries. in *Protides of the Biological Fluids*, Proc. 2nd Colloquium Bruges, 1954, pp. 111-118, Elsevier, Amsterdam, 1955.

92. Eckerstrom (S.), Glanse (S.), Hanson (L. A.), Knutsen (T.) et Brattsten (I.). — Studies of an abnormal γ-globulin in a case of suspected multiple myeloma. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1961, *51*, 321-330.

93. Edelman (G. M.). — Dissociation of γ-globulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, *81*, 3155-3156.

94. Edelman (G. M.), Heremans (J. F.), Heremans (M. T.) et Kunkel (H. G.). — Immunological studies of human γ-globulin ; relation of the precipitin lines of whole γ-globulin to those of the fragments producted by papain. *J. Exp. Med.*, 1960, *112*, 203-223.

95. Edelman (G. M.) et Poulik (M. D.). — Studies on structural units of γ-globulins. *J. Exp. Med.*, 1961, *113*, 861-884.

96. Edelman (G. M.) et Poulik (M. D.). — Characterisation of subunits of γ-globulins. *Federation Proc.*, 1961, *20*, 387.

97. Engle (R. L.), Woods (K. R.) et Pert (J. H.). — Starch gel electrophoresis of serum proteins and urinary proteins from patients with multiple myeloma. *J. Clin. Invest.*, 1957, *36*, 888-889.

98. Engle (R. L.) et Woods (K. R.). — Comparative biochemistry and embryology. in Putnam (F. W.), *The Plasma Proteins*, vol. 2, pp. 230-234, Academic Press, New-York, 1960.

99. Engle (R. L.), Woods (K. R., Castillo (G. B.) et Pert (J. H.). — Starch gel electrophoresis of serum proteins and urinary proteins from patients with multiple myeloma, macroglobulinemia, and other forms of dysproteinemia. *J. Lab. Clin. Med.*, 1961, *58*, 1-22.

100. Fagreus (A.). — Antibody production in relation to development of plasma cells ; in vivo and vitro experiments. *Acta Med. Scand.*, 1948, *suppl. 204*, 3-122.

101. Fahey (J. L.), Mac Coy (P. F.) et Goulian (M.). — Chromatography of serum proteins in normal and pathological sera. The distribution of protein bound carbohydrate and cholesterol, siderophilin, thyroxin-binding protein, B_{12}-binding protein, alkaline and acid phosphatases, radio-iodinated albumin and myeloma protein. *J. Clin. Invest.*, 1958, *37*, 272-284.

102. Fahey (J. L.), Mac Coy (P. F.) et Horbett (A. P.). — Chromatographic characterisation of the serum protein changes in pathologic sera. *J. Clin. Invest.*, 1958, *37*, 893.

103. Fahey (J. L.) et Horbett (A. P.). — Human gamma globulin fractionation on anion exchange cellulose columns. *J. Biol. Chem.*, 1959, *234*, 2645-2651.

104. Fahey (J. L.), Potter (M.), Gutter F(. J.) et Dunn (T. B.). — Distinctive myeloma globulins associated with a new plasma cell neoplasm of strain C_3H mice. *Blood,* 1960, *15,* 103-113.

105. Fahey (J. L.) et Askonas (B. A.). — Relationships of Bence-Jones protein to myeloma protein formed in the same tumor and to normal gamma globulin. *Federation Proc.,* 1961, *20,* 382.

106. Fahey (J. L.). — The nature of the myeloma globulin. *Clin. Radiol.,* 1961, *12,* 26-28.

107. Fahey (J. L.). — Immunochemical studies of twenty mouse myeloma proteins : evidence for two groups of proteins similar to gamma and beta 2A globulins in man. *J. Exp. Med.,* 1961, *114,* 385-398 et Physicochemical characterization of mouse myeloma proteins : demonstration of heterogeneity for each myeloma globulin. *ibid.* 399-413.

108. Fauvert (R.) et Hartmann (L.). — Détermination qualitative et quantitative des protéines urinaires. *J. Urol.,* 1953, *59,* 732-746.

109. Fauvert (R.), Hartmann (L.), Mallarme (J.) et Boivin (P.). — Renseignements fournis par l'étude quantitative et qualitative des protéines sériques au cours de 85 cas de maladie de Kahler. *Rev. Praticien,* 1959, *9,* 1749-1762.

110. Ferrini (U.), Antonini (E.) et Caputo (A.). — Dissociation of Bence-Jones protein a low ph. *Abstracts V^e Congrès Internat. Biochim. Moscou,* 1961, p. 54, Pergamon Press, New-York, 1961.

111. Ferrini (U.) et Zito (R.). — Action of trypsin on Bence-Jones protein derivatives. *Nature,* 1961, *189,* 485.

112. Filitti-Wurmser (S.), Hugon (M. P.) et Hartmann (L.). — Identification immunoélectrophorétique des constituants lourds du sérum normal. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.,* 1958, *3,* 1080-1082.

113. Fine (J. M.), Vincon-Alriq, Eyquem (A.) et Groulade (J.). — Contribution à l'étude électrophorétique du sérum au cours des maladies du sang et des organes hématopoiétiques. *Presse Méd.,* 1954, *62,* 1043-1045.

114. Fine (J. M.), Creyssel (R.) et Morel (P.). — L'apport de l'électrophorèse en gel d'amidon à l'étude des constituants protéiques sériques au cours des dysprotéinémies. *Rev. Hémat.,* 1959, *14,* 71-90.

115. Fine (J. M.) et Creyssel (R.). — Starch gel electrophoresis studies on abnormal proteins in multiple myeloma and macroglobulinaemia. *Nature,* 1959, *183,* 392.

116. Fine (J. M.) et Creyssel (R.). — Contribution à l'étude immunochimique des « globulines anormales » du sérum au cours du myélome. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.,* 1961, *6,* 766-772.

117. Fine (J. M.), Dormont (J.), Mery (J. P.), Creyssel (R.), Groulade (J.) et Debray-Sachs (M.). — Etudes sur la nature d'une pyroglobuline sérique observée au cours du myélome. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1961, *6*, 864-870.

118. Flynn (F. V.) et Stow (E. A.). — Fractionation of Bence-Jones proteins by starch gel electrophoresis. *J. Clin. Path.*, 1958, *11*, 334-338.

119. Franek (F.). — Dissociation of animal 7S γ-globulins by cleavage of disulfide bonds. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 1961, *4*, 28-32.

120. Franklin (E. C.) et Kunkel (H. G.). — Immunologic differences between the 19S and 7S components of normal human serum. *J. Immunol.*, 1957, *78*, 11-18.

121. Franklin (E. C.). — Immunologic differences between the 7S and 19S components of normal human γ-globulin ; antigenic specificity of the 7S component. *J. Imunol.*, 1960, *85*, 138-143.

122. Freund (J.). — Some aspects of active immunisation. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1947, *1*, 291-308.

123. Fried (M.), Frankel (F. R.) et Putnam (F. W.). — Comparative studies of partial hydrolysates of Bence-Jones proteins. *Federation Proc.*, 1958, *17*, 223.

124. Fried (M.) et Putnam (F. W.). — Relationships between peptides sequences in normal and abnormal gamma-globulins. *Federation Proc.*, 1959, *18*, 230.

125. Fried (M.) et Putnam (F. W.). — Comparative studies of partial hydrolysates of Bence-Jones proteins. *J. Biol. Chem.*, 1960, *235*, 3472-3477.

126. Fruhling (L.) et Chadli (A.). — Les tumeurs malignes primitives de la moelle osseuse. Evolution hématopoiétique. Les sarcomes médullaires. *Ann. Ana. Path.*, 1957, *2*, 325-401.

127. Gabeloteau (C.) et Desnuelle (P.). — Sur quelques peptides formés au cours de l'autolyse de la trypsine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, *40*, 35-43.

128. Gaidano (G.), Vitelli (A.), Cattaneo (C.) et Mattei-Grandis (C.). — Ricerche analitiche sulla disprotidemia e dislipidemia nel plasmocitoma. *Minerva Med.*, 1959, *50*, 3753-3761.

129. Gitlin (D.), Gross (P. A.) et Janeway (C. A.). — Gamma globulins and their clinical significance. I. Chemistry, immunology and metabolism. *New England J. Med.*, 1959, *260*, 21-27.

130. Gitlin (D.) et Merler (E.) — Similarity of peptides in two antigen-combining fragments released from a rabbit antibody by papain. *Nature*, 1961, *190*, 634-635.

131. Glaus (A.). — Ueber multiple Myelocytom mit eigenartigen, zum Teil kristallæhnlichen Zellerinlagerungen, kombiniert mit Elastolyse und ausgedehnter Amyloidose und Verkalkung. *Virchow's Arch. Path. Anat. und Physiol.*, 1917, *223*, 301-339.

132. Goa (J.). — On protein bound carbohydrates in human serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1955, *7*, suppl. 22, 1-55.

133. Gobert-Jones (J. A.). — Unusual urine protein in myelomatosis. *Lancet,* 1957, 273, 1068.

134. Gomes da Costa (S. F.), Filipe da Silva (J. A.), Chaves (F. J.) et Crespo (E. V.). — O isolamento de protidos circulantes « especificos » por immunoelectroforese. *Arq. Port. Bioquim.,* 1961, *5,* 146-162.

135. Gomes da Costa (S. F.), Ducla Soares (A.), Braulio da Silva (A.), Machado Caetano (A.) et Filipe da Silva (J. A.). — L'utilisation des immunsérums « anti-sérum spécifique » pour l'étude des protides circulant anormaux. *Clin. Chim. Acta,* 1961, *6,* 377-387.

136. Gordon (A. H.), Keil (B.), Sebesta (K.), Knessl (O.) et Sorm (F.). — Electrophoresis of proteins in agar jelly. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.,* 1950, *15,* 1-16.

137. Grabar (P.) et Williams (C. A.). — Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta,* 1953, *10,* 193-194.

138. Grabar (P.) et Williams (C. A.). — Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta,* 1955, *17,* 67-74.

139. Grabar (P.), Fauvert (R.), Burtin (P.) et Hartmann (L.). — Etude sur les protéines du myélome. II. L'analyse immunoélectrophorétique des sérums de 30 malades. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.,* 1956, *1,* 175-186.

140. Grabar (P.). — The use of immunochemical methods in studies on proteins. *Advances in Protein Chem.,* 1958, *13,* 1-33.

141. Grabar (P.) et Burtin (P.). — *Analyse immunoélectrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques humains.* Masson, Paris, 1960.

142. Griffiths (L. L.) et Brews (V. A.). — The electrophoretic pattern in multiple myelomatosis. *J. Clin. Path.,* 1953, *6,* 187-192.

143. Grisolia (F. T.) et Cohen (P. P.). — Aminoacids analysis of serum proteins in multiple myeloma. *Cancer Res.,* 1953, *13,* 851-854.

144. Gross (P.) et Weicker (H.). — Die Bedeutung des Lipoidelektrophoresediagrammes. *Klin. Woch.,* 1954, *32,* 509-514.

145. Gross (P. A.), Gitlin (D.) et Janeway (C. A.). — Gamma globulins and their clinical significance. III. Hypergammaglobulinemia. *New England J. Med.,* 1959, *260,* 121-125.

146. Grumer (H. D.) et Ruske (W.). — N-Endgruppen Bestimmung an einem Bence-Jones Eiweiskœrper. *Z. Naturforsch.,* 1954, *9b,* 415-417.

147. Gutman (A. B.). — The plasma proteins in diseases. *Advances in Protein Chem.,* 1948, *4,* 155-250.

148. Hampton (J. W.). — Waldenstrœm's macroglobulinemia; clinical and pathological report of a case resembling multiple myeloma. *New England J. Med.,* 1958, *258,* 1293-1296.

149. Hardy (S.) et Putnam (F. W.). — Protein synthesis in multiple myeloma. *Federation Proc.*, 1953, *12*, 214.

150. Hardy (S.) et Putnam (F. W.). — Proteins in multiple myeloma. IV. Interaction with metabolic nitrogen. *J. Biol. Chem.*, 1955, *212*, 371-378.

151. Harris (T. N.) et Harris (S.). — Genesis of antibodies. *Am. J. Med.*, 1956, *20*, 327-333.

152. Hartmann (L.), Boivin (P.) et Fauvert (R.). — Macroglobulines et macroglobulinémies. *Exp. Ann. Biochim. Med.*, 1957, *19*, 13-43.

153. Hartmann (L.) et Toilliez (M.). — Microméthode d'étude en gélose de la réaction antigène-anticorps. (Variante du procédé d'Ouchterlony). *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1957, *2*, 197-199.

154. Harvier (P.) et Rangier (M.). — Caractères chimiques de l'albumine de Bence-Jones. *C. R. Acad. Sci.*, 1943, *216*, 131-133.

155. Havez (R.). — Possibilités et limites de l'électrophorèse sur papier dans l'étude des milieux biologiques humains. *Thèse Méd.*, Lille, 1956, N° 7.

156. Havez (R.) et Biserte (G.). — Origine plasmocytaire d'une globuline myélomateuse β_2. Etude de ses rapports immunoélectrophorétiques avec la β_{2a}-globuline. *Clin. Chim. Acta*, 1959, *4*, 694-700.

157. Havez (R.), Biserte (G.), Leroy (N.), Laturaze (J.) et Boniface (L.). — Applications de la chromatographie sur DEAE-cellulose à l'étude des gamma-globulines normales et pathologiques. *Path. Biol.*, 1961, *9*, 1689-1704.

158. Hayem-Lévy (A.). — Cancer et glycoprotéides des liquides biologiques. *Thèse Pharm.*, Lille, 1960, N° 258.

159. Hektoen (L.) et Werker (W. H.). — Immunological differences of crystalline Bence-Jones proteins. *Biochem. J.*, 1940, *34*, 487-489.

160. Heremans (J. F.) et Heremans (M. T.). — A new human serum protein : β_{2a}-globulin. Its isolation, properties and pathology. *Abstracts IV^e Cong. Internat. Biochim. Vienne*, 1958, p. 195, Pergamon Press, London, 1958.

161. Heremans (J. F.). — Immunochemical studies on protein pathology. The immuno-globulin concept. *Clin. Chim. Acta*, 1959, *4*, 639-646.

162. Heremans (J. F.). — *Les globulines sériques du système gamma. Leur nature et leur pathologie.*. Arscia, Bruxelles et Masson, Paris, 1960.

163. Hermann (G.). — Zur Diagnose und Therapie der Plasmocytomkrankheit. in *Protides of the Biological Fluids*, Proc. 5th Colloquium Bruges 1957, pp. 231-237, Elsevier, Amsterdam, 1958.

164. Hewitt (L. F.). — Bence-Jones proteins. *Biochem. J.*, 1929, *23*, 1147-1152.

165. Hill (R. M.), Dunlop (S. G.) et Mulligan (R. M.). — A cryoglobulin present in high concentration in the plasma of multiple myeloma. *J. Lab. Clin. Med.*, 1949, *34*, 1057-1065.

166. Hillmann (A.). Hillmann (G.) et Lohss (F.). — Myelom Plasma Proteine. I. Mitteilung. Ueber die chemische und physikalische Natur der Myelome γ-Globuline. *Z. Naturforsch.*, 1953, *8b*, 28-33.

167. Hirs (C. H.). — The oxidation of ribonuclease with performic acid. *J. Biol. Chem.*, 1956, *219*, 611-622.

168. Holleman (J. W.). — Aspects de la structure de quelques chromoprotéides. *Thèse Sci.*, Lille, 1958, N° 43.

169. Hopkins (F. G.) et Savory (H.). — A study of Bence-Jones protein and of the metabolism in three cases of Bence-Jones proteinuria. *J. of Physiol.*, 1911, *42*, 189-250.

170. Horner (H.). — Makroglobulinæmie Waldenstrœm mit osteolytische Herden. *Klin. Woch.*, 1955, *33*, 1110.

171. Hougton (P.) et Martin (N. H.). — The myeloma globulins. *Brit. J. Cancer*, 1960, *14*, 709-715.

172. Hsiao (S. H.) et Putnam (F. W.). — The cleavage of human γ-globulin by papain. *J. Biol. Chem.*, 1961, *236*, 122-135.

173. Huisman (T. H.) et Van der Wal (B.). — Investigations on a heat coagulable globulin in the blood of a patient with multiple myeloma. *Clin. Chim. Acta*, 1956, *1*, 525-532.

174. Humphrey (J. H.) et Fahey (J. L.). — The metabolism of normal plasma proteins and gamma-myeloma proteins in mice bearing plasma-cell tumors. *J. Clin. Invest.*, 1961, *40*, 1696-1705.

175. Hutchinson (H. E.). — Cryoglobulinaemia ; a clinical pathological account of two cases. *J. Clin. Path.*, 1956, *9*, 185-190.

176. Jansen (L. W.) et Gormsen (H.). — Changes in the composition of the human serum in certain bone-marrow diseases. (Multiple myeloma). in *Electrophoretic studies on serum proteins*, North Holland, Amsterdam, 1951.

177. Jim (R. T.) et Steinkamp (R. C.). — Macroglobulinemia and its relationship to other paraproteins. *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, *47*, 540-561.

178. Jirgensons (B.), Landua (A. J.) et Awapara (J.). — Study of the physicochemical and chemical properties of Bence-Jones proteins from multiple myeloma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, *9*, 625-632.

179. Jirgensons (B.) et Cooper (J. A.). — Abnormal globulins in some neoplastic diseases. *Clin. Chim. Acta*, 1956, *1*, 16-23.

180. Jirgensons (B.), Ikenaka (T.) et Gorguraki (V.). — Concerning chemistry and testing of Bence-Jones proteins. *Clin. Chim. Acta*, 1959 *4*, 876-882.

181. Kabat (E. A.) et Murray (J. P.). — A comparison of human γ-globulins in the reactivity with rabbit anti-γ-globulin by the quantitative precipitin method. *J. Biol. Chem.*, 1950, *182*, 251-259.

182. Kabat (E. A.). — Multiple myeloma. Current clinical and chemical concepts (Combined Staff Clinic). *Am. J. Med.*, 1957, *23*, 299-306.

183. Kahler (H.). — Zur Symptomatologie des multiplen Myeloms. *Prag. Med. Woch.*, 1889, *14*, 33-42.

184. Kappeler (R.), Gugler (E.) et Riva (G.). — Zur Frage des atypischen Morbus Waldenstrœm. *Schweiz. Med. Woch.*, 1959, *89*, 1331-1336.

185. Kekwick (R. A.). — Serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem. J.*, 1940, *34*, 1248-1257.

186. Kempf (J. E.). — La sécrétion des immunoglobulines sériques par le plasmocyte. *Thèse Méd.*, Strasbourg, 1961, N° 19.

187. Kimmel (J. R.) et Smith (E. L.). — Crystalline papaine. Preparation, specificity and activation. *J. Biol. Chem.*, 1954, *207*, 515-531.

188. Kimmel (J. R.) et Smith (E. L.). — The properties of papain. *Advances in Enzymol.*, 1957, *19*, 267-334.

189. Korngold (L.) et Lipari (R.). — Multiple myeloma proteins. I. Immunological studies. *Cancer*, 1956, *9*, 183-192 et II. Antigenic relationship of Bence-Jones protein to normal gamma-globulin and multiple myeloma serum proteins. *ibid.* 262-272.

190. Korngold (L.). — Antigenic relationship of gamma-globulins, cryoglobulins and macroglobulins. *Federation Proc.*, 1957, *15*, 597.

191. Kubota (C.), Schwartz (S. O.) et Putnam (F. W.). — Multiple myeloma : correlation of clinical, marrow and electrophoretic findings. *Acta Haemat.*, 1956, *16*, 105-116.

192. Kunkel (H. G.), Slater (R. J.) et Good (R. A.). — Relation between certain myeloma proteins and normal gamma globulins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1951, *67*, 190-195.

193. Kyle (R. A.), Bayrd (E. D.), Mac Kenzie (B. F.) et Heck (F. J.). — Diagnostic criteria for electrophoretic patterns of serum and urinary proteins in multiple myeloma. *J. Am. Med. Assoc.* 1960, *174*, 245-251.

194. Lawson (H. A.), Stuart (C. A.), Paull (A. M.), Phillips (A. M.) et Phillips (R. W.). — Observations on the antibody content of the blood in patients with multiple myeloma. *New England J. Med.*, 1955, *252*, 13-18.

195. Lebouc (R.). — Contribution à l'étude clinique et biologique du myélome multiple. *Thèse Méd.*, Paris, 1956, N° 682.

196. Lennard-Jones (J. E.). — Myelomatosis with lipaemia and xanthomata. *Brit. Med. J.*, 1960, *I*, 781-783.

197. Lévy (A. L.). — A paper chromatographic method for the quantitative estimation of amino-acids. *Nature*, 1954, *174*, 126-127.

198. Lewis (L. A.) et Page (I. H.). — Serum proteins and lipoproteins in multiple myelomatosis. *Am. J. Med.*, 1954, *17*, 670-673.

199. Lièvre (J. A.), Camus (J. P.), Lévy (R.), Badin (J.), Bessis (M.) et Tessier (F.). — Myélome à globuline cristallisable. Etude physicochimique et microscopie électronique. *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 1961, *1*, 23-35.

200. Lohss (F.), Hillmann-Elies (A.) et Hillmann (G.). — Myelom-Plasma-Protein. II. Mitteilung. Zur physikalische und chemischen Natur der α und β Myelomproteine. *Z. Naturforsch.*, 1953, *8b*, 619-624.

201. Longsworth (L. G.), Shedlovsky (T.) et Mac Innes (D. A.). — Electrophoretic patterns of normal and pathological human blood serum and plasma. *J. Exp. Med.*, 1939, *70*, 399-413.

202. Lynn (L. T.), Phelps (R. A.) et Putnam (F. W.). — Résultats non publiés, cités dans Punam (F. W.), *The Plasma Proteins*, Academic Press, New-York, 1960.

203. Mac Connel (R. J.) et Martin (N. H.). — The myeloma globulins. *Brit. J. Cancer*, 1958, *12*, 264-274.

204. Mac Fadden (M. L.) et Smith (E. L.). — The free amino-groups of γ-globulins of different species. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, *75*, 2784-2785.

205. Mac Farlane (A. S.). — Behaviour of urinary proteins in ultracentrifuge. *Biochem. J.*, 1935, *29*, 1202-1208.

206. Mac Kay (I. R.), Eriksen (N.), Motulski (A.) et Volwiler (G.). — Cryo and macroglobulinaemia. Electrophoretic, ultracentrifugal and clinical studies. *Am. J. Med.*, 1956, *20*, 564-587.

207. Magalini (S. I.), Stefanini (M.) et Marin (H. M.). — Diagnostic significance of changes in free, esterified and protein-bound cholesterol, lipo and glycoproteins in lymphoma and multiple myeloma. *Am. J. Med. Sci.*, 1956, *231*, 155-164.

208. Magnus-Lévy (A.). — Ueber die Myelomkrankheit ; vom Stoffwechsel ; die Bence-Jones Proteinurie. *Z. Klin. Med.*, 1932, *119*, 307-362.

209. Magnus-Lévy (A.). — Multiple Myelome ; der Stoffwechsel ausserhalb der Proteinurie. *Z. Klin. Med.*, 1932, *120*, 313-320.

210. Magnus-Lévy (A.). — Multiple myeloma. *Acta Med. Scand.*, 1938, *95*, 217-280.

211. Maiorca (R.) et Scarpioni (L.). — Carbohydrate content of anomalous seroglobulin and Bence-Jones protein in myeloma. *Clin. Chim. Acta*, 1961, *6*, 403-406.

212. Mallarmé (J.), Hartmann L.), Boivin (P.), Orcel (L.) et Fauvert (R.). — La macroglobulinémie de Waldestroœm. *Path. Biol.*, 1957, *5*, 1519-1545.

213. Mandema (E.), Van der Schaff (P. C.) et Huisman (T. H.). — Investigations on the amino-acide composition of a macroglobulin and a cryoglobulin. *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, *45*, 261-269.

214. Marchal (G.), Fine (J. M.) et Duhamel (G.). — Le diagnostic de la maladie de Kahler par l'étude électrophorétique de la dysglobulinémie. *Presse Méd.*, 1960, *68*, 1695-1696.

215. Marnay (A.), Moretti (J.) et Jayle (M. F.). — Paragammaglobulinémies révélées par l'électrophorèse à travers gel d'amidon. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1959, *4*, 366-370.

216. Martin (E.) et Scheidegger (J. J.). — Aperçu des renseignements fournis par l'immunoélectrophorèse. *Bull. Acad. Suisse Sci. Méd.*, 1957, *13*, 526-534.

217. Martin (N. H.). — A study of the plasma and tissue globulins in myelomatosis. *J. Clin. Invest.*, 1947, *26*, 1189-1190.

218. Martin (W. J.) et Mathieson (D. R.). — Pyroglobulinemia (heat coagulable globulin in the blood). *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1953, *28*, 545-554.

219. Martin (W. J.), Mathieson (D. R.) et Eigler (J. O.). — Pyroglobulinemia : further observations and review of 20 cases. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1959, *34*, 95-101.

220. Massini (R.). — Untersuchungen bei einem Falle von Bence-Jones'scher Krankheit. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1911, *104*, 29-43.

221. Meyer (F.). — C^{14} lysine incorporation into Bence-Jones protein by culture of myeloma bone marrow. *Federation Proc.*, 1957, *16*, 222.

222. Michon (P.) et Streiff (F.). — *Macroglobulinémie de Waldenstrœm.* Masson, Paris, 1959.

223. Miller (L. L.), Bly (C. G.), Watson (M. F.) et Bale (W. F.). — The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. *J. Exp. Med.*, 1951, *94*, 431-453.

224. Miller (G. L.), Brown (C. E.), Miller (E. E.) et Eitelman (E. S.). — An electrophoretic study on the origin of the abnormal plasma proteins in multiple myeloma. *Cancer Res.*, 1952, *12*, 716-719.

225. Mller (L. L.) et Bale (W. F.). — Synthesis of all plasma protein fractions except γ-globulin by the liver. *J. Exp. Med.*, 1954, *99*, 125-130.

226. Milliez (P.), Dreyfus (B.) et Rathery (M.). — Myélome ou cryptoleucose à plasmocytes. Caractères particuliers de la prolifération plasmocytaire. *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1947, *63*, 860-866.

227. Monnier (P.), Arnavielhe-Bony (M.), Sany (C.) et Garrigue (J.). — Plasmocytes et globulines gamma. *Ann. Biol. Clin.*, 1958, *16*, 448-458.

228. Montreuil (J.) et Biserte (G.). — Acide sialique et spécificité de la réaction à l'acide periodique-fuchsine de Schiff appliquée à l'électrophorèse sur papier. Exemple particulier de l'orosomucoïde. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, *41*, 959-973.

229. Moore (D. H.), Kabat (E. A.) et Gutman (A. B.). — Bence-Jones proteinemia in multiple myeloma. *J. Clin. Invest.*, 1943, *22*, 67-75.

230. Moore (D. H.). — Clinical and physiological applications of electrophoresis. in Bier (M.), *Electrophoresis, Theory. Methods and applications*, pp. 369-425, Academic Press, New-York, 1959.

231. Moretti (J.), Boussier (G.) et Jayle (M. F.). — Réalisation technique et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, *39*, 593-605.

232. Morton (J. I.) et Deutsch (H. F.). — Demonstration of a marked Bence-Jones proteinemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, *93*, 402-404.

233. Morton (J. I.) et Deutsch (H. F.). — Some immunochemical relations of Bence-Jones and hyperglobulinémic serum proteins of multiple myeloma patients. *Cancer Res.*, 1958, *18*, 1221-1224.

234. Müller-Eberhard (H. J.), Kunkel (H. G.) et Franklin (E. C.). — Two types of γ-globulin differing in carbohydrate content. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, *93*, 146-150.

235. Müller-Eberhard (H. J.) et Kunkel (H. G.). — The carbohydrates of γ-globulin and myeloma proteins. *J. Exp. Med.*, 1956, *104*, 253-269.

236. Müller-Eberhard (H. J.) et Nilsson (U.). — Relation of a β-glycoprotein of human serum to the complement system. *J. Exp. Med.*, 1960, *111*, 217-234.

237. Nathans (D.), Fahey (J. L.) et Potter (M.). — The formation of myeloma protein by a mouse plasma-cell tumor. *J. Exp. Med.*, 1958, *108*, 121-130.

238. Neely (R. A.) et Neil (D. W.). — Electrophoretic studies on the serum proteins in neoplasic disease involving the haematopoietic and reticuloendothelial system. *Brit. J. Haemat.*, 1956, *2*, 32-40.

239. Neufeld (A. H.). — A new concept of the metabolism of the pathological proteins in myelomatosis. *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 1957, *35*, 977-981.

240. Nikkila (E.). — Studies on the lipid-protein relationships in normal and pathological sera and the effect of heparin on serum lipoproteins. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1953, *5*, suppl. 8, 1-101.

241. Nikkila (E.) et Pesola (P.). — Serum protein-bound carbohydrate pattern in normal subjects and in patients with multiple myeloma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1960, *12*, 209-220.

242. Nisonoff (A.) et Woernley (D. L.). — Effect of hydrolysis by papain on the combining sites of an antibody. *Nature*, 1959, *183*, 1325-1326.

243. Nisonoff (A.), Wissler (F. C.) et Woernley (D. L.). — Mechanism of formation of univalent fragments of rabbit antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1959, *1*, 318-322.

244. Nisonoff (A.), Wissler (F. C.), Lipman (L. N.) et Woernley (D. L.). — Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, *89*, 230-244.

245. Nisonoff (A.), Wissler (F. C.) et Lipman (L. N.). — Properties of the major component of peptic digest of rabbit antibody. *Science*, 1960, *132*, 1770-1771.

246. Northrop (J. H.) et Kunitz (M.). — In Abderhalden (E.), *Handbuch der biologischer Arbeitsmethoden*, p. 2213, Berlin, 1936.

247. Olhagen (B.), Thorell (D.) et Wising (P.). — The endocellular nucleic acid distribution and plasma protein formation in myelomatosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1949, *1*, 49-59.

248. Olmer (J.), Mongin (M.) et Martin (M.). — Intérêt de l'électrophorèse sur papier dans les leucoses, les réticulopathies malignes et dans l'individualisation des « dysglobulinémies primitives ». *Presse Méd.*, 1956, *64*, 101-103.

249. Olmer (J.), Mongin (M.), Muratore (R.) et Denizet (D.). — *Myélomes, macroglobulinémies et dysglobulinémies voisines.* Masson, Paris, 1961.

250. Olmer (J.), Mongin (M.) et Muratore (R.). — Leucoses à plasmocytes .(A propos de deux observations). *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 1961, *1*, 614-615.

251. Onat (A.) et Cooper (T.). — Relation of bone marrow findings to serum protein changes in lymphosarcoma, chronic lymphocytic leukemia and Hodgkin's disease. *Blood*, 1960, *15*, 114-129.

252. Oncley (J. L.), Melin (M.), Richert (D. A.), Cameron (J. W.) et Gross (P. M.). — The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and β_1 lipoprotein into subfractions of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, *71*, 541-550.

253. Osserman (E. F.) et Lawlor (D. F.). — Preliminary observations on difference in carbohydrate binding between abnormal serum and urine proteins of multiple myeloma. *Science*, 1954, *120*, 715-716.

254. Osserman (E. F.) et Lawlor (D.). — Abnormal serum and urine protein in 35 cases of multiple myeloma, as studied by filter paper electrophoresis. *Am. J. Med.*, 1955, *18*, 462-476.

255. Osserman (E. F.). — Multiple myeloma : current clinical and chemical concepts. *Am. J. Med.*, 1957, *23*, 283-309.

256. Osserman (E. F.), Graff (A.), Marshall (M.), Lawlor (D.) et Graff (S.). — Incorporation of N^{15}-L-aspartic acid into abnormal serum and urine proteins of multiple myeloma. Studies of interrelationship of these proteins. *J. Clin. Invest.*, 1957, *36*, 352-360.

257. Osserman (E. F.). — Plasma-cell myeloma. II. Clinical aspects. *New England J. Med.*, 1959, *261*, 952-960.

258. Osserman (E. F.) et Lawlor (D.). — Immunoelectrophoretic characterization of the serum and urinary proteins in plasma cell myeloma and Waldenstrœm's macroglobulinemia. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1961, *94*, 93-109.

259. Ouchterlony (O.). — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, 1949, *26*, 507-515.

260. Oudin (J.). — Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, 222, 115-116.

261. Oudin (J.). — La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues : étude quantitative des trois principales variables. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, *228*, 1890-1892.

262. Owen (J. A.), Rider (W. D.) et Stewart (C. P.). — The value of serum and urinary proteins in the diagnosis of myelomatosis. in *Protides of the Biological Fluids* (Proc. 4th Colloquium Bruges 1956), pp. 103-110, Elsevier, Amsterdam, 1957.

263. Owen (J. A.) et Rider (W. D.). — Electrophoresis of serum and urinary proteins in the diagnosis of myelomatosis. *J. Clin. Path.*, 1957, *10*, 373-378.

264. Owen (J. A.), Rider (W. D.) et Newall (J.). — Serum proteins in myelomatosis : a follow un study. *Clin. Chim. Acta*, 1957, *2*. 522-526.

265. Owen (J. A.). — Paper electrophoresis of proteins and protein bound substances in clinical investigations. *Advances in Clin. Chem.*, 1958, *1*, 237-300.

266. Owen (J. A.) et Rider (W. D.). — Myelomatosis with the « α_2 type » serum protein pattern. *Blood*, 1958, *13*, 475-482.

267. Owen (J. A.), Got (C.) et Silberman (H. J.). — Heterogeneity of serum myeloma globulins. *Clin. Chim. Acta*, 1958, *3*, 605-607.

268. Owen (J. A.) et Got (C.). — The biological significance of the anomalous serum and urinary proteins of myelomatosis, lymphoma, and other conditions. *J. Clin. Path.*, 1960, *13*, 58-68.

269. Papastamatis (S. C.), Kench (J. E.) et Wilkinson (J. F.). — Amino-acid composition of Bence-Jones protein. *Nature*, 1949, *164*, 961.

270. Pedersen (K. O.). — *Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions*. Almqvist et Wiksells, Upsala, 1945.

271. Perlzweig (W. A.), Delrue (G.) et Geschickter (C.). — Hyperproteinemia associated with multiple myeloma. *J. Am. Med. Assoc.*, 1928, *90*, 755-757.

272. Petermann (M. L.) et Pappenheimer (A. M.). — Ultracentrifugal analysis of diphteria proteins. *J. Phys. Chem.*, 1941, *45*, 1-9.

273. Petermann (M. L.), Hamilton (M. G.) et Korngold (L.). — Multiple myeloma proteins. Ultracentrifugal and electrophoretic analysis of paucidisperse myeloma globulin. *Cancer*, 1956, *9*, 193-194.

274. Petermann (M. L.). — Alterations in plasma proteins in disease. in Putnam (F. W.), *The Plasma Proteins*, vol. 2, pp. 333-336, Academic Press, New-York, 1960.

275. Peterson (E. A.) et Sober (H. A.). — Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, *78*, 751-756. et II. Fractionation of serum proteins on anion exchange cellulose. *ibid*, 756-762.

276. Peterson (E. A.) et Sober (H. A.). — Chromatography of the plasma proteins. in Putnam (F. W.), *The Plasma Proteins*, vol. 2, pp. 241-271, Academic Press, New-York, 1960.

277. Peterson (E. A.), Wickoff (M. M.) et Sober (H. A.). — Gradient chromatography of human serum proteins and its application to the examination of « albumin » and « globulin » obtained by ammonium sulfate fractionation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, *93*, 428-434.

278. Phelps (R. A.), Neet (K. E.), Lynn (L. T.) et Putnam (F. W.). — The cupric ion catalysis of the cleavage of γ-globulin and other proteins by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 1961, *236*, 96-105.

279. Polonovski (M.) et Delbarre (F.). — Etude biochimique de la protéine de Bence-Jones. Recherche et dosage de la méthionine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, *32*, 382-388.

280. Polonovski (M.) et Delbarre (F.). — Les protéines de Bence-Jones. *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1951, *12*, 257-301.

281. Polonovski (M.) et Delbarre (F.). — Etude biochimique de la cryoprotéinémie myélomateuse. *Semaine Hôp., Arch. Biol. Méd.*, 1954, *5*, 259-264.

282. Polonovski (M.), Delbarre (F.) et Lévy (G.). — Etude de la composition des protéines kahlériennes et de leur teneur en méthionine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, *36*, 1273-1277.

283. Porges (R. F.). — A method for demonstrating secondary agammaglobulinemia in patients with multiple myeloma using paper electrophoresis. *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, *47*, 960-968.

284. Porter (R. R.). — Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature*, 1958, *182*, 670-671.

285. Porter (R. R.). — The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with cristalline papain. *Biochem. J.*, 1959, *73*, 119-126.

286. Porter (R. R.). — γ-globulin and antibodies. in Putnam (F. W.), *The Plasma Proteins*, vol. 1, pp. 105-138, Academic Press, New-York, 1960.

287. Potter (M.), Fahey (J. L.) et Pilgrim (H. I.). — Abnormal serum proteins and bone destruction in transmissible mouse plasma-cell neoplasm. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, *94*, 327-333.

288. Poulik (M. D.). — Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 1957, *180*, 1477-1479.

289. Poulik (M. D.) et Edelman (G. M.). — Comparison of reduced alkylated derivatives of some myeloma globulins and Bence-Jones proteins. *Nature*, 1961, *191*, 1274-1276.

290. Prager (M. D.), Speer (R. J.), Hill (J. M.), Williams (J.) et Goerner (M.). — Protein fractionation. II. Chromatography of serum proteins of patients with acute leukemia and multiple myeloma. *J. Lab. Clin. Med.*, 1959, *54*, 694-706.

291. Putnam (F. W.) et Udin (B.). — Proteins in multiple myeloma. I. Physicochemical study of serum proteins. *J. Biol. Chem.* 1953, *202*, 727-743.

292. Putnam (F. W.) et Stelos (P.). — Proteins in multiple myeloma. II. Bence-Jones proteins. *J. Biol. Chem.*, 1953, *203*, 347-358.

293. Putnam (F. W.). — N-terminal groups of normal human γ-globulins and of myeloma proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, *75*, 2785-2786.

294. Putnam (F. W.) et Miyake (A.). — On the non-identity of Bence-Jones proteins. *Science*, 1954, *120*, 848-849.

295. Putnam (F. W.) et Hardy (S.). — Proteins in multiple myeloma. III. Origin of Bence-Jones protein. *J. Biol. Chem.*, 1955, *212*, 361-369.

296. Putnam (F. W.). — Abnormal human serum globulins. *Science*, 1955, *122*, 275-277.

297. Putnam (F. W.) et Miyake (A.). — Proteins in multiple myeloma. VI. Cryoglobulins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, *65*, 39-49.

298. Putnam (F. W.), Meyer (F.) et Miyake (A.). — Proteins in multiple myeloma. V. Synthesis and excretion of Bence-Jones protein. *J. Biol. Chem.*, 1956, *221*, 517-528.

299. Putnam (F. W.). — Aberrations of protein metabolism in multiple myeloma : interrelationships of abnormal serum globulins and Bence-Jones proteins. *Physiol. Rev.*, 1957, *37*, 512-538.

300. Putnam (F. W.) et Miyake (A.). — Proteins in multiple myeloma. VII. The free amino groups of Bence-Jones proteins. *J. Biol. Chem.*, 1957, *227*, 1083-1091.

301. Putnam (F. W.) et Fried (M.). — Comparative studies of partial hydrolysates of Bence-Jones proteins. *Abstracts IV^e Cong. Intern. Biochim. Vienne*, 1958, p. 24, Pergamon Press, New-York, 1958.

302. Putnam (F. W.) et Miyake (A.). — Proteins in multiple myeloma. VIII. Biosynthesis of abnormal proteins. *J. Biol. Chem.*, 1958, *231*, 671-684.

303. Putnam (F. W.), Miyake (A.) et Meyer (F.). — The metabolism of DL-glutamic acid 1-C14 in man. *J. Biol. Chem.*, 1958, *231*, 657-669.

304. Putnam (F. W.). — Abnormal human serum globulins. II. Physical constants and amino-end groups. *J. Biol. Chem.*, 1958, *233*, 1448-1454.

305. Putnam (F. W.). — Plasma cell myeloma and macroglobulinemia. I. Physicochemical, immunochemical and isotopic turnover studies of the abnormal serum and urinary proteins. *New England J. Med.*, 1959, *261*, 902-908.

306. Putnam (F. W.). — *The plasma proteins*, vol. 2, pp. 345-406, Academic Press, New-York, 1960.

307. Putnam (F. W.). — Structure of normal and abnormal human γ-globulins. *Abstracts V^e Cong. Intern. Biochim. Moscou*, 1961. Pergamon Press, New-York, 1961.

308. Reiner (M.) et Stern (K. G.). — Electrophoretic studies on protein distribution in serum of multiple myeloma patients. *Acta Haemat.*, 1953, *9*, 19-29.

309. Rice (W. G.). — The occurence of a P.A.S. positive protein fraction in paper electrophoresis of serum in myelomatosis. *J. Lab. Clin. Med.*, 1954, *44*, 544-553.

310. Roberts (E.), Ramasarma (G. B.) et Lewis (H. B.). — Amino-acids of Bence-Jones protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, *74*, 237-241.

311. Rosevear (J. W.) et Smith (E. L.). — Structure of glycopeptides from a human γ-globulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, *80*, 250-251.

312. Rosevear (J. W.) et Smith (E. L.). — Glycopeptides. I. Isolation and properties of glycopeptides from a fraction of γ-globulin. *J. Biol. Chem.*, 1961, *236*, 425-435.

313. Ruffié (R.), Fournié (A.), de Boissezon (J. F.), Valdiguié (P.) et Ayrolles (C.). — Diagnostic du myélome plasmocytaire. Apport de l'immunoélectrophorèse dans certaines formes incomplètes. *Rev. Rhumat.*, à paraître.

314. Rundles (R. W.), Dillon (M. L.) et Dillon (E. S.). — Multiple myeloma. III. Effect of urethane therapy on plasma cell growth, abnormal serum protein components and Bence-Jones proteinemia. *J. Clin. Invest.*, 1950, *29*, 1243-1260.

315. Rundles (R. W.), Cooper (G. R.) et Willett (R. W.). — Multiple myeloma. IV. Abnormal serum components and Bence-Jones protein. *J. Clin. Invest.*, 1951, *30*, 1125-1142.

316. Sachs (B.), Cady (P.) et Ross (G.). — An abnormal lipid-like material and carbohydrate in the sera of patients with multiple myeloma. *Am. J. Med.*, 1954, *17*, 662-669.

317. Sanger (F.). — The free amino-groups of insulin. *Biochem. J.*, 1945, *39*, 507-515.

318. Scheidegger (J. J.). — Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Intern. Arch. Allergy*, 1955, *7*, 103-110.

319. Scheidegger (J. J.) et Roulet (H.). — Applications pratiques de la méthode immunoélectrophorétique. Premiers résultats. *Praxis*, 1955, *44*, 73-76.

320. Scheidegger (J. J.). — L'immunoélectrophorèse. *Semaine Hôp.*, 1956, *32*, 2119-2134.

321. Scheidegger (J. J.). — L'analyse immunoélectrophorétique des liquides biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, *39*, suppl. 1, 45-63.

322. Scheidegger (J. J.) et Buzzi (C.). — Etude immunoélectrophorétique des gamma-globulines. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.* 1957, *2*, 895-906.

323. Schless (G. L.). — Serum cholesterol-globulin complex in multiple myeloma. *Am. J. Med. Sci.*, 1958, *235*, 562-565.

324. Schrade (W.), Bohle (E.) et Becker (G.). — Ueber die Ausscheidung von Lipoproteiden im Urine bei den sœgenannten Albuminurien. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1955, *202*, 415-436.

325. Schrade (W.), Bohle (E.) et Bruch (H.). — Ein Beitrag zur Kenntnis der Kryoglobuline. *Klin. Woch.*, 1956, *34*, 695-698.

326. Schrade (W.), Bohle (E.), Biegler (R.) et Bruch (H.). — Ueber den Lipid und Kohlenhydratgehalt des Bence-Jonesschen Eiweisskœrpers. *Klin. Woch.*, 1957, *35*, 767-771.

327. Schreier (K.). — Ueber den Methioningehalt des Bence-Jonesschen Eiweisskœrpers. *Klin. Woch.*, 1950, *28*, 106-107.

328. Schreier (K.) et Pluckthun (H.). — Ueber die Aminosaürezusammensetzung der Bence-Jones Proteine. *Klin. Woch.*, 1952, *30*, 677-679.

329. Schultze (H. E.) et Schwick (G.). — Immunchemischer Nachweis von Proteinveræenderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipo-Proteine. Immunoelektrophoretische Studien. *Behringwerk-Mitteilungen*, 1957, *33*, 11-38.

330. Schultze (H. E.), Gollner (I.), Heide (K.), Schonenberger (M.) et Schwick (G.). — Zur Kenntnis der α-Globuline des Menschlichen normal Serums. *Z. Naturforsch*, 1955, *10b*, 463-473.

331. Schultze (H. E.) et Schwick (G.). — Quantitative immunologische Bestimmung von Plasmaproteinen. *Clin. Chim. Acta*, 1959, *4*, 15-25.

332. Schultze (H. E.). — The synthesis of antibodies and proteins. *Clin. Chim. Acta*, 1959, *4*, 610-626.

333. Seligmann (M.) et Bernard (J.). — Quelques données apportées par l'électrophorèse du sérum en hématologie. (Avec étude particulière de 34 leucémies). *Gazette Méd. France*, 1954, *61*, 543-548.

334. Seligmann (M.), Alais (L.) et Bernard (J.). — Analyse immunoélectrophorétique du sérum de cent malades atteints de leucoses. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1959, *4*, 901-910.

335. Seligmann (M.) et Burtin (P.). — Analyse immunoélectrophorétique du sérum au cours des leucoses et des sarcomatoses. in Grabar (P.) et Burtin (P.), *Analyse Immunoélectrophorétique. Applications aux liquides biologiques humains*, pp. 197-205, Masson, Paris, 1960.

336. Seligmann (M.) et Hamard (M.). — Modifications des protéines sériques au cours des leucoses lymphoïdes chroniques. *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 1961 *1*, 755-765.

337. Sellers (A.) et Marmorston (J.). — Electrophoretic study of human urinary protein in disease. *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, *47*, 248-254.

338. Serre (H.) et Jaffiol (C.). — Les anomalies protéiques dans le myélome multiple. Les formes biologiques atypiques et l'origine des protéines myélomateuses. *Presse Méd.*, 1958, *66*, 2044-2047.

339. Serre (H.), Jaffiol (C.) et Dauverchain (J. C.). — L'origine des protéines pathologiques dans le myélome multiple. Données nouvelles apportées par l'immunoélectrophorèse de la moelle osseuse. *Rev. Rhumat.*, 1958, *25*, 531-542.

340. De Sèze (S.) et Ryckewaert (A.). — *Maladies des os et des articulations*, p. 307, Flammarion, Paris, 1954.

341. Silberman (H. J.). — Multiple myelomatosis and macroglobulinemia. Differentiation by starch gel electrophoresis. *Lancet*, 1957, *273*, 26-27.

342. Slater (R. J.), Ward (S. M.) et Kunkel (H. G.). — Immunological relationships among the myeloma proteins. *J. Exp. Med.*, 1955, *101*, 85-108.

343. Smith (E. L.), Brown (D. M.), Mac Fadden (M. L.), Buettner-Janusch (V.) et Jager (B. V.). — Physical, chemical, and immunological studies on globulins from multiple myeloma. *J. Biol. Chem.*, 1955, *216*, 601-620.

344. Smithies (O.). — Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 1955, *61*, 629-641.

345. Smithies (O.). — Grouped variations in the occurence of new protein components in normal serum. *Nature*, 1955, *175*, 307-308.

346. Snapper (I.), Turner (L. B.) et Moscovitz (H. L.). — *Multiple myeloma*. Grune et Stratton, New-York, 1953.

347. Sonnet (J.). — Electrophorèse et tests de floculation dans le myélome. *Rev. Belge Path. Méd. Exp.*, 1954, *23*, 197-207.

348. Sonnet (J.), Louis (L.) et Heremans (J.). — Les hydrates de carbone des paraprotéines sériques. Démonstration de la présence de fucose, galactose, mannose et glucosamine. *Acta Haemat.*, 1955, *14*, 193-199.

349. Sonnet (J.), Gillant (G.) et Sokal (G.). — Démonstration de la synthèse de paraprotéines sériques par des plasmocytes, grâce au glucose uniformément marqué par le ^{14}C. *Rev. Belge Path. Méd. Exp.*, 1958, *54*, 685-693.

350. Soons (J. B.) et Westenbrink (H. G.). — Experiments on the localization of pathological serum protein synthesis in myelomatosis. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, *40*, 1803-1815.

351. Soulier (J. P.). — L'électrophorèse dans le myélome. *Le Sang*, 1950, *21*, 37-49.

352. Soulier (J. P.). — Etude électrophorétique de 86 cas de protéinurie. *Presse Méd.*, 1953, *61*, 49-52.

353. Soulier (J. P.). — Etude électrophorétique de la protéinurie dans les myélomes. *Transfusion sanguine et actualités hématologiques*. Masson, Paris, 1954.

354. Soulier (J. P.). — Propriétés physicochimiques des principales protéines plasmatiques. *Path. Biol.*, 1961, *9*, 1789-1800.

355. Spain (D. M.), Greenblatt (I. J.), Snapper (I.) et Cohn (T.). — Degree of coronary and aortic atherosclerosis in necropsied cases of multiple myeloma. *Am. J. Med. Sci.*, 1956, *231*, 165-167.

356. Speer (R. J.), Prager (M. D.), Kelley (T. F.) et Hill (J. M.). — Protein fractionation. I. Chromatography of serum proteins on DEAE-cellulose with special reference to blood group antibodies. *J. Lab. Clin. Med.*, 1959, *54*, 685-693.

357. Steyn-Parve (E. P.) et Ten Thije (O. J.). — Investigation of urinary proteins in multiple myeloma by means of salting-out analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, *16*, 609-610.

358. Stiehm (E. R.), Morton (J. I.) et Deutsch (H. F.). — Some immunologic properties of papain digest fragments of multiple myeloma proteins. *J. Immunol.*, 1960, *85*, 337-345.

359. Svedberg (T.) et Pedersen (K. O.). — *The ultracentrifuge*. Oxford University Press, London, 1940.

360. Szeinberg (A.), Weissman (S. L.) et Tauman (G.). — A case of multiple myeloma with two abnormal serum globulin fractions detected by means of paper electrophoresis. *Am. J. Clin. Path.*, 1959, *32*, 257-260.

361. Ten Thije (O. J.). — *De eiwitten inurine en serum bij de zieckte van Kahler*. Drukkerij Fa. Schotanus et Jens, Utrecht, 1954.

362. Ten Thije (O. J.). — Urinary and serum proteins in myelomatosis. *Acta Med. Scand.*, 1956, *153*, 253-269.

363. Tombs (M. P.), James (D. C.) et Mac Lagan (N. F.). — The chromatography of serum proteins with special reference to α-globulins. *Clin. Chim. Acta*, 1961, *6*, 163-169.

364. Tombs (M. P.), Cooke (K. B.), Burston (D.) et Mac Lagan (N. F.). — The chromatography of normal serum proteins. *Biochem. J.*, 1961, *80*, 284-292.

365. Truax (W. E.), Bray (J.) et Perry (J. E.). — A method for demonstrating probable synthesis of protein by bone marrow cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 1961, *57*, 54-64.

366. Truax (W. E.) et Bray (J.). — Synthesis of M proteins by mouse myeloma tumor : correlation of in vitro and in vivo methods. *Blood*, 1961, *18*, 176-181.

367. Uriel (J.) et Scheidegger (J. J.). — Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, *37*, 165-168.

368. Vieux (R.). — L'électrophorèse du sérum dans les hémopathies malignes. (A propos de 173 observations). *Thèse Méd.*, Lyon, 1955, N° 224.

369. Vis (H.) et Crokaert (R.). — Contribution à l'étude des protéines de Bence-Jones. *Acta Clin. Belg.*, 1956, *11*, 455-503.

370. Waldenstrom (J.). — Incipient myelomatosis or essential « hyperglobulinemia » with fibrinogenopenia - a new syndrom ? *Acta Med. Scand.*, 1944, *117*, 216-247.

371. Waldenstrom (J.). — Abnormal proteins in multiple myeloma. *Advances Int. Med.*, 1952, *5*, 398-440.

372. Waldenstrom (J.). — The changing concepts of multiple myeloma. *Acta Paediat.*, 1954, *43*, 87-96.

373. Waldenstrom (J.). — Sur les dysprotéinémies. *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1958, *19*, 45-52.

374. Wallenius (G.), Trautman (R.), Kunkel (H. G.) et Franklin (E. C.). — Ultracentrifugal studies of major non-lipide electrophoretic components of normal human serum. *J. Biol. Chem.*, 1957, *225*, 253-267.

375. Warter (J.), Metais (P.) et Mantz (J. M.). — Maladie de Kahler et paraprotéinurie. *Semaine Hôp.*, 1958, *34*, 2919-2930.

376. Weicker (H.). — Der Nachweiss von acetonumlœslichen Lipoproteinen in Plasmocytomeiweiss im Bence-Jones Eiweisskœrper. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1956, *203*, 79-87.

377. Weissmann-Netter (R.) et Hirsch-Marie (H.). — Les perturbations lipoprotéiniques au cours des myélomes. *Presse Méd.*, 1958, *66*, 1787-1788.

378. Weissmann-Netter (R.) et Hirsch-Marie (H.). — Notions actuelles sur l'identification et l'interprétation des protéines de Bence-Jones. *Path. Biol.*, 1960, *8*, 1009-1021.

379. Wiedman (E.). — L'électrophorèse. *Rev. Hémat.*, 1948, *3*, 251-275.

380. Wieme (R. J.). — Méthode nouvelle permettant la démonstration directe de macroglobulines. *Rev. Belge Path. Méd. Exp.*, 1957, *27*, 62-67.

381. Williams (C. A.). — Etude des gamma-globulines humaines à l'aide de la réaction de floculation spécifique par un immunsérum de cheval. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, *36*, 1407-1415.

382. Williams (C. A.) et Grabar (P.). — Immunoelectrophoretic studies on serum proteins. I. The antigen of human serum protein. *J. Immunol.*, 1955, *74*, 158-168. II. Immune sera : antibodies distribution. *ibid.* 397-403. III. Human gamma globulin. *ibid.* 404-410.

383. Wilson (D. W.). — A spontaneous cristallisation of a Bence-Jones protein. *J. Biol. Chem.*, 1923, *56*, 203-214.

384. Winzler (R. J.). — Glycoproteins. in Putnam (F. W.), *The Plasma Proteins*, vol. 1, pp. 331, Academic Press, New-York, 1960.

385. Wuhrmann (F.), Wunderly (C.) et Wiedemann (E.). — Ueber das Alpha-globulins Plasmocytom. *Schweiz. Med. Woch.*, 1948. *78*, 180-182.

386. Wuhrmann (F.), Wunderly (C.) et Hugentobler (F.). — Ueber Bluteiweissuntersuchungen bei 60 Fællen von Plasmocytom und ihre Klinische. *Dtsch. Med. Woch.*, 1949, *74*, 481-486.

387. Wuhrmann (F.), Wunderly (C.) et Hassig (A.). — Immunological investigations in ten cases of plasmocytoma. *Brit. J. Exp. Path.*, 1950, *31*, 507-514.

388. Wuhrmann (F.) et Wunderly (C.). — *Les protéines du sang humain*, p. 396, Flammarion, Paris, 1961.

389. Wunderly (C.), Gloor (E.) et Hassig (A.). — Immunochemical study of isolated serum protein fractions. *Brit. J. Exp. Path.*, 1953, *34*, 81-87.

395. Wunderly (C.) et Piller (S.). — Die Færbung der im Blutserum enthaltenen Proteine, Lipoide, und Kohlenhydrate nach Papier-Elektrophorese. Eine chemische Trias. *Klin. Woch.*, 1954, *32*, 425-432.

391. Wunderly (C.) et Caspani (R.). — Moderne acquisizioni sulle uroproteine. *Minerva Med.*, 1954, *45*, 909-918.

392. Wunderly (C.). — Immunoelectrophoresis : Methods, interpretation, results. *Advances Clin. Chem.*, 1961, *4*, 207-273.

393. Zak (S. J.) et Good (R. A.). — Immunochemical studies of human serum γ-globulins. *J. Clin. Invest.*, 1959, *38*, 579-586.

394. Ziff (M.) et Lospalluto (J.). — Unusual chromatographic behavior of serum macroglobulins. *J. Clin. Invest.*, 1959, *38*, 1057-1058.

Table des matières

INTRODUCTION 17

HISTORIQUE 19

Première Partie. — LA NOTION DE GLOBULINES IMMUNES OU GLOBULINES DU SYSTEME GAMMA.

1. — L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DES γ-GLOBULINES 23
   - A) *Les données de l'électrophorèse* 23
   - B) *L'apport des méthodes de fractionnement du plasma et de l'ultracentrifugation* 23
   - C) *L'immunoélectrophorèse* 24
   - D) *La chromatographie sur celluloses* 24
   - E) *Fractionnement par réduction* 24

2. — COMPARAISON IMMUNOCHIMIQUES DES GLOBULINES IMMUNES.
   - A) *La multiplicité des déterminants antigéniques de la γ-globuline* 25
   - B) *Parenté immunochimiques des globulines γ, β_{2a} et β_{2m}* 25
   - C) *Conclusion. La notion de système γ ou de globulines immunes* 26

Deuxième Partie. — DONNEES ACTUELLES SUR LES PROTEINES MYELOMATEUSES.

CHAPITRE PREMIER. — LA DYSPROTÉINÉMIE DU MYÉLOME 29

A) *Aspects physicochimiques* 29
- 1° Les données de l'électrophorèse 29
- 2° Les données de l'ultracentrifugation 35
- 3° Les résultats chromatographiques 37
- 4° La cryo-précipitation 39

B) *Aspects chimiques et biochimiques* 41
- 1° Composition en amino-acides 41
- 2° Nature des groupements α-aminés terminaux .. 42
- 3° Teneur en glucides 43
- 4° Teneur en lipides 45
- 5° Etude des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique et des fragments fournis par réduction .. 46

C) *Aspects immunologiques* 50
- 1° Les résultats classiques 50
- 2° Les données de l'immunoélectrophorèse 52
- 3° Propriétés immunologiques et hydrolyses enzymatiques 57

D) *Aspects physiopathologiques et nosologiques* 60
- 1° Plasmocytes et globulines myélomateuses 60
- 2° Rapports entre la dysglobulinémie du myélome et les autres dysglobulinémies malignes 65
  - *a*) la maladie de WALDENSTROM 65
  - *b*) les hémopathies malignes 66

Chapitre II. — Les protéines de Bence-Jones 69
A) *Propriétés physicochimiques* 69
1° La thermosolubilité. Recherche et dosage des protéines de B.-J. Fréquence du phénomène 69
2° Purification et cristallisation 72
3° Les données de l'électrophorèse 72
4° Les données de l'ultracentrifugation. - Poids moléculaire 74
5° Chromatographie sur cellulose 75
B) *Propriétés chimiques et biochimiques* 76
1° Composition en amino-acides 76
2° Nature des groupements terminaux 77
3° Teneur en glucides et en lipides 78
4° Etude des peptides libérés par hydrolyse enzymatique 79
C) *Propriétés immunologiques* 80
1° Etude immunologique 80
2° La détection immunologique 84
3° Le problème de la spécificité des protéines de B.-J. 85
D) *Problèmes physiopathologiques* 86
1° Origine des protéines de B.-J. 86
2° Etudes isotopiques sur la synthèse et l'excrétion des protéines de B.-J. 87
Chapitre III. — Rapports entre syndromes biochimique et clinique 91

Troisième partie. — RECHERCHES PERSONNELLES.

Chapitre premier. — Présentation des observations 99
Chapitre II. — Isolement des protéines myélomateuses 119
A) *Protéines sériques* 119
B) *Protéines de* Bence-Jones 126
Chapitre III. — Etude des groupements N-terminaux .. 129
A) *Méthodes de détermination* 129
B) *Résultats* 131
Chapitre IV. — Hydrolyse enzymatique des protéines myélomateuses 135
A) *Méthodes d'hydrolyse* 135
a) les enzymes 135
b) méthodes de dénaturation protéique 136
c) conduite des hydrolyses 137
B) *Méthodes d'étude des produits d'hydrolyse enzymatique* 140
1° Séparation électrochromatographique des peptides 140
a) Technique 140
b) Résultats 142
c) Discussion 155
2° Etude immunologique des hydrolysats 164
Conclusion 171